

**Keratinozytenwachstumsfaktor reduziert das alveoläre Ödem
in isogenen Lungentransplantaten der Ratte**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jenny Sadovski
aus Atbasar (Kasachstan)

Gießen 2013

Aus der Sektion Experimentelle Chirurgie
am Klinikum für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Leitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Gutachter: Frau Prof. Dr. V. Grau

Gutachter: Prof. Dr. A. Menke

Tag der Disputation: 25.02.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das pulmonale Dilemma	1
1.2 Ischämie & Reperfusion in der Lungentransplantation	1
1.3 Blut-Luft-Schranke	4
1.4 Surfactantsystem	4
1.5 Keratinozytenwachstumsfaktor	5
1.5.1 Pulmonale Protektion durch exogenen KGF	6
1.5.2 Protektive Mechanismen des exogenen KGF	7
1.5.2.1 Reparatur des geschädigten Alveolarepithels	7
1.5.2.2 Stimulierung des Surfactantsystems	8
1.5.2.3 Stabilisierung der Barrierefunktion	8
1.5.2.4 Rekombinanter humaner Δ N23-trunkierter KGF	8
1.6 Stereologie als Methode der quantitativen Analyse	9
1.6.1 Geschichtliches & einige Grundgedanken	9
1.6.2 „Design-based“ Stereologie	11
1.6.2.1 Design & Prinzipien der Stichprobennahme	11
1.6.2.2 Gewebeaufbereitung & systematischer Fehler	12
1.6.2.3 Semidünne Lungenschnitte & systematischer Fehler	12
1.6.2.4 Absolutes Lungenvolumen & „reference trap“	13
1.6.3 Strukturelemente der Lunge - unterschiedliche Definitionen von Stereologen & Anatomen	14
1.7 Zielsetzung	15
2 Material & Methoden	16
2.1 Materialien, Reagenzien, Medikamente & Pufferlösungen	16
2.2 Experimentelles Vorgehen	20
2.2.1 Versuchstiere	20
2.2.2 Behandlung der Transplantatspender	20
2.2.3 Lungentransplantation bei der Ratte	20
2.2.4 Gewebeaufbereitung für die Stereologie	22
2.2.4.1 Intravasale Perfusionsfixierung	22
2.2.4.2 Ermittlung der absoluten Lungenvolumina	22
2.2.4.3 Gewinnung und Aufbereitung der Lungenproben	23
2.2.5 Gewebeaufbereitung für die Immunhistologie	25
2.2.5.1 Paraffinpräparate	25
2.2.5.2 Gefrierpräparate	27
2.2.5.3 Immunhistologie	27
2.3. Stereologische Analyse	29
2.3.1 Ebene der Sichtfelder: Level I & Level II	29
2.3.2 Volumendichte & massenspezifisches Volumen	30
2.3.3 Stereologisch-lichtmikroskopische online-Analyse	31

2.3.4 „Point counting“: Rasterkreuze oder Testpunkte?	32
2.3.5 Level-I-Analyse	33
2.3.6 Level-II-Analyse	34
2.4 Datenverarbeitung und Statistik	35
2.4.1 Immunhistologische Präparate	35
2.4.2 Stereologische Daten	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Lungenpräparate für die Stereologie	36
3.1.1 Volumendichten	37
3.1.2 Massenspezifische Volumina	38
3.2 Immunhistologie	40
4 Diskussion	47
4.1 Das experimentelle Modell des I&R-Schadens	47
4.2 Stereologie versus gravimetrische Analyse	48
4.3 KGF schützt vor dem I&R-assoziierten Alveolarödem	48
4.3.1 Histomorphologie der Präparate für die Stereologie	48
4.3.2 Stereologische Daten	49
4.3.2.1 Volumendichten des alveolären Ödems	49
4.3.2.2 Fraktion „alveolar edema“/„septal tissue“	50
4.3.2.3 Funktionelle Auswirkungen des alveolären Ödems	51
4.3.2.4 Geschätztes pulmonales Oxygenierungspotential	51
4.3.2.5 Massenspezifische Volumina des alveolären Ödems	52
4.3.3 Vermittlung des protektiven KGF-Effektes durch Surfactant	53
4.4 Infiltration durch Makrophagen & T-Lymphozyten	53
4.5 Exogener KGF & allogene Lungentransplantate der Ratte	54
4.6 Schlussfolgerungen	55
5 Zusammenfassung/Summary	57
6 Abkürzungs-, Abbildungs- & Tabellenverzeichnisse	61
6.1 Abkürzungen	61
6.2 Abbildungen	63
6.3 Tabellen	63
7 Literaturverzeichnis	64

1 Einleitung

1.1. Das pulmonale Dilemma

Das Lungenparenchym eines pulmonal gesunden Erwachsenen birgt dank ca. 480 Millionen Alveolen eine Gasaustauschfläche von ca. 120-140 m² in sich (Ochs et al. 2004, Ochs 2006a). Die Blut-Luft-Schranke ist ca. 0,6 µm* dünn (Weibel 2000, Gehr et al. 1978). Das ist somit ca. 1/167 eines Blattes üblichen Schreibpapiers**. Damit verleiht die Natur den Lungen einerseits die perfekten Voraussetzungen für eine effiziente Ausführung ihrer Hauptaufgabe, die Regulierung der O₂- und CO₂-Konzentration im Blut (Weibel 1984, Weibel 2000). Andererseits resultiert aus der filigranen Parenchymarchitektur eine immense Vulnerabilität. Die Tatsache, dass das Lungengewebe nicht zugleich robust sein kann, stellt ein bekanntes Dilemma dar (Maina & West 2004, Weibel 1984, Weibel 2000). Die Schädigung der zarten Blut-Luft-Schranke durch sowohl endogene als auch exogene Faktoren verschiedener Art führt zur Bildung eines Lungenödems***, das in kurzer Zeit einen effizienten Gasaustausch teilweise oder sogar komplett behindert (Ochs 2006b, Bernard et al. 1994, Ashbaugh et al. 1967, Ware & Matthay 2000).

1.2 Ischämie & Reperfusion in der Lungentransplantation

Eine Lungentransplantation (**LTx**) stellt für viele Patienten mit einer Lungenerkrankung im Endstadium die letzte therapeutische Option dar (Christie et al. 2012, Grover et al. 1997). Abgesehen von der für die Organtransplantation typischen Problematik der spezifischen Immunabwehr, die eine akute bzw. chronische Transplantatabstoßung nach sich zieht, erleiden die Lungentransplantate durch die unvermeidbare Ischämie und Reperfusion (**I&R**) einen nicht zu unterschätzenden Schaden (de Perrot et al. 2003). Durch Faktoren wie den Hirntod des Donors (Bittner et al. 1995, Kusaka et al. 2000), die Denervation durch den chirurgischen Eingriff, bakterielle bzw. virale Infektionen und prolongierte maschinelle Beatmung werden die Auswirkungen des I&R-Schadens zusätzlich noch verstärkt (de Perrot et al. 2003).

* Harmonischer Mittelwert (Hsia et al. 2009, p. 408)

** Das übliche Schreibpapier bzw. das Kopierpapier (80 g/m²) ist ca. 0,1 mm dünn.

*** Das Lungenödem lässt sich histomorphologisch in interstitielles, peribronchovaskuläres und alveoläres Ödem unterteilen. Das alveoläre Ödem spielt dabei im Vergleich zum interstitiellen und peribronchovaskulären Ödem sowohl in quantitativer Hinsicht als auch im Bezug auf das resultierende Oxygenierungsdefizit die führende Rolle (Fehrenbach et al. 1999b, Ochs 2006b, Ochs et al. 2000, Fehrenbach et al. 2001a).

Der transplantationsassoziierte I&R-Schaden ist ein bekannter Auslöser der Lungeninsuffizienz in den ersten 72 h nach LTx (de Perrot et al. 2003, van Raemdonck et al. 2004, Christie et al. 2005b). Diese frühe Insuffizienz des Lungentransplantates wird als „primary lung graft dysfunction“ (**PGD**)* bezeichnet (Christie et al. 2005a). Primär werden durch den transplantationsassoziierten I&R-Schaden die Blut-Luft-Schranke und das Surfactantsystem geschädigt (Ochs et al. 1999, Fehrenbach et al. 2000a, Hohlfeld et al. 1998).

Das Fehlen der mechanischen Komponente des Blutflusses während der Ischämie („non-hypoxic lung ischemia“, de Perrot et al. 2003, Zhao et al. 1997) führt durch die endothelassoziierte Mechanotransduktion (Lansman 1988) zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, **ROS**) (Al Mehdi et al. 1998). Das Reagieren von NO**, als einer reaktiven Stickstoffspezies („reactive nitrogen species“, **RNS**), mit ROS führt zu einer zusätzlichen Schädigung der Alveolarepithelzellen Typ II (**AE II**) sowie einer strukturellen bzw. funktionellen Beeinträchtigung des Surfactantsystems (de Perrot et al. 2003, Fehrenbach et al. 2001c, Putman et al. 1997).

Die I&R-assoziierte Schädigung des Surfactantsystems ist eine der wichtigsten Ursachen des I&R-assoziierten alveolären Ödems und kann unabhängig von einem Ödem in den Alveolen auftreten (Ochs et al. 1999, Ochs et al. 2000, Ochs 2006a). Die Plasmaproteine des alveolären Ödems sind imstande das alveoläre Surfactant wiederum zu inaktivieren und seine Schädigung in einem circulus vitiosus zu verstärken bzw. zu unterhalten (Griese 1999, Seeger et al. 1993). Die I&R-assoziierte Beeinträchtigung des Surfactantsystems führt durch den alveolären Kollaps zu massiven Atelektasen, intrapulmonalen Shunts und zur Erhöhung des pulmonal-arteriellen Widerstandes. Es resultiert eine Verschlechterung der pulmonalen Compliance und Oxygenierungsleistung (Ochs et al. 1999, Ochs et al. 2000, Veldhuizen et al. 1993, Hohlfeld et al. 1998). Durch den transplantationsassoziierten I&R-Schaden wird außerdem eine wichtige Komponente der angeborenen Immunabwehr angegriffen (s. 1.4; McCormack & Whitsett 2002). Die Behandlung der Transplantat-spender mit Surfactant sowohl in verschiedenen tierexperimentellen Modellen des transplantationsassoziierten I&R-Schadens (Erasmus et al. 1996, Erasmus et al. 2002, Hohlfeld et al. 1999, Günther et al. 2004) als auch in einer klinischen Studie der LTx (Strüber et al. 1999) zeigte sich als effektiv.

* Syn.: „early graft dysfunction“, „primary graft failure“, „reimplantation edema/response“, „reperfusion edema/injury“ (Christie et al. 2005a, Christie et al. 2005b)

** NO (Syn.: EDRF, „endothelium-derived relaxing factor“) stellt ein bioaktives Molekül dar, das neben den für den Organismus nützlichen z.B. vasomotorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften imstande ist, auch destruktive Funktionen auszuüben. In Analogie zu den ROS („reactive oxygen species“), die für den oxidativen Stress zuständig sind, können RNS („reactive nitrogen species“) den nitrosativen Stress auslösen (Radi et al. 1991).

Zu den wichtigen Initiatoren der Lungenschädigung durch den transplantationsassoziierten I&R-Schaden zählen die während der Ischämiezeit aktivierten pulmonalen Makrophagen (**MF**) (de Perrot et al. 2003, Eppinger et al. 1997, Fiser et al. 2001b). Fiser et al. (2001a) zeigten in einer Untersuchung des transplantationsassoziierten I&R-Schadens in isolierten, beatmeten und mit Blut perfundierten Kaninchenlungen, dass die perioperative Ischämie zur Aktivierung der pulmonalen Donor-MF führt. Durch das Freisetzen proinflammatorischer Mediatoren ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$) triggern MF die frühe Phase (30 min) der Reperfusionsschädigung, aktivieren im Folgenden die zirkulierenden Leukozyten des Empfängers und rekrutieren sie in das Lungentransplantat (Fiser et al. 2001a, de Perrot et al. 2003). Die Leukozyten des Empfängers triggern die späte Phase (2 h) der Reperfusionsschädigung (Fiser et al. 2001a, Eppinger et al. 1995, Welbourn et al. 1991). Die Mediatorensysteme schaukeln sich gegenseitig auf und tragen somit zu einer Eskalation bzw. Aufrechterhaltung der Lungenschädigung bei (Eppinger et al. 1997, de Perrot et al. 2003, Novick et al. 1996). Die endothelialen Adhäsionsmoleküle, die für eine Transmigration der an der Inflammation beteiligten Leukozyten sorgen, werden hochreguliert (Wilkes et al. 2005). Das Komplementsystem - ein wichtiger Teil der angeborenen Immunabwehr - wird durch den I&R-Schaden aktiviert (Naka et al. 1997). Der oxidative Stress greift die Zellmembranen an (Fisher et al. 1991, Eckenhoff et al. 1992, Novick et al. 1996). Der Untergang von Kapillarendothelzellen und Alveolarepithelzellen Typ I (**AE I**) führt zu einer Denudation der Basalmembranen (Ochs 2006b). Es bildet sich proteinreiches Lungenödem (Ochs 2006b, Khan et al. 1999, Matthay & Ingbar 1998). Die Beeinträchtigung der Na^+/K^+ -ATPase während der kalten Ischämiezeit führt zusätzlich zur gestörten transepithelialen Clearance der alveolären Flüssigkeit (de Perrot et al. 2003). Die pulmonale Gasaustauschfunktion bricht zusammen.

PGD stellt eine Form der Lungeninsuffizienz im Sinne von „acute lung injury“ (**ALI**)* bzw. „acute respiratory distress syndrome“ (**ARDS**)* dar (Ochs 2006b, Christie et al. 2005b, Ashbaugh et al. 1967, Bernard et al. 1994, Bachofen & Weilbel 1982).

* Obwohl die im Jahre 2012 verabschiedete Berliner ARDS-Definition (ARDS Definition Task Force/Ranieri et al. 2012) den Gebrauch des Begriffes „acute lung injury“ (ALI) nicht mehr vorsieht, wurde in der vorliegenden Arbeit auf diesen Terminus absichtlich nicht verzichtet. Die klinische Entität ALI wurde über mehrere Jahre verwendet, um eine Form von „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) mit einem Oxygenierungsindex $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ von 200 mmHg bis 300 mmHg im intensivmedizinischen Alltag zu definieren (Ochs 2006b, Bernard et al. 1994). ARDS stellt eine massive akute Reaktion der Lunge dar, die innerhalb einer Woche nach einem akuten Ereignis oder nach neu aufgetretenen bzw. sich verschlechternden respiratorischen Symptomen beginnt. Der Entzündungsmechanismus kann sowohl direkt (primär pulmonal) als auch indirekt (systemisch) ausgelöst werden. Die Permeabilitätserhöhung der Blut-Luft-Schranke bzw. die Zerstörung des Surfactantsystems führt zu bilateralen Verdichtungen in der Röntgendiagnostik und die vorliegende respiratorische Insuffizienz lässt sich nicht durch ein kardiales Versagen oder eine Hypervolämie erklären. ARDS wird nach der Berliner Definition anhand des Oxygenierungsindex $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ bei einem PEEP $\geq 5 \text{ H}_2\text{O}$ in 3 Grade eingeteilt: Mild, moderat und schwer (ARDS Definition Task Force/Ranieri et al. 2012, Ware & Matthay 2000).

In dem 29. ISHLT-Bericht (International Society for Heart and Lung Transplantation) aus dem Jahre 2012 bleibt PGD eine der führenden Ursachen für die Mortalität in den ersten 30 Tagen nach LTx (Christie et al. 2012). PGD fördert die Episoden der akuten Abstoßung und begünstigt dadurch die Entwicklung der chronischen Abstoßungsreaktion (Lee & Christie 2009, Fiser et al. 2002, Wilkes et al. 2005, King et al. 2000). PGD ist mit einer erhöhten Morbidität bzw. Mortalität nach LTx assoziiert (de Perrot et al. 2003, Christie et al. 2012, Christie et al. 2005a). Eine hyperakute Abstoßung, Obstruktion der Venenanastomosen, kardiogenes Lungenödem und Pneumonie viraler bzw. bakterieller Genese müssen bei der Identifizierung von PGD ausgeschlossen werden (Christie et al. 2005b). Schließlich sollte man bedenken, dass im klinischen PGD-Bild das transplantationsassoziierte chirurgische Trauma bzw. der mechanische Beatmungsschaden von dem transplantationsassoziierten I&R-Schaden nicht zu differenzieren sind.

1.3 Blut-Luft-Schranke

Die Blut-Luft-Schranke umfasst Kapillarendothel, Alveolarepithel und die dazwischen liegenden miteinander verschmolzenen Basalmembranen (Ochs 2006b, Fehrenbach 2001b). AE I sind äußerst vulnerable, flach ausgezogene Zellen, die den überwiegenden Teil (ca. 95%) der alveolären Oberfläche auskleiden (Bachofen & Weibel 1977). Die resistenteren AE II bedecken nur einen geringen Teil der alveolären Oberfläche (ca. 5%), indem sie einzeln oder in kleinen Gruppen in den Nischen der Alveolen liegen (Weibel 2000). AE I sind terminal differenzierte Zellen und können nicht proliferieren. AE II sind dagegen zu Proliferation und Differenzierung in AE I fähig und somit für Regeneration bzw. Reparatur des Alveolarepithels zuständig (Fehrenbach 2001b). AE II synthetisieren, sezernieren, recyceln bzw. bauen Surfactant ab (Griese 1999, Weibel 2000, de Perrot et al. 2003, Ochs 2006b). AE II sind außerdem an zahlreichen immunregulatorischen Interaktionen beteiligt (Fehrenbach 2001b).

1.4 Surfactantsystem

Surfactant („surface active agent“) ist eine oberflächenaktive Substanz, die zu ca. 90% aus Lipiden und zu ca. 10% aus Proteinen besteht (Griese 1999, Ochs 2006a). Die Mehrheit der Surfactantlipide sind Phospholipide (80-90%). Dipalmitoylphosphatidylcholin macht dabei 65% der Phospholipide aus (Fehrenbach 2001b, Griese 1999). Die Proteine bestehen in erster Linie aus Plasmaproteinen und Surfactantproteinen (**SP**) A, B, C und D. SP-A, SP-B und SP-D werden von AE II und Clara-Zellen synthetisiert. SP-C wird von AE II

und broncho-alveolären Stammzellen synthetisiert (Griese 1999, Yano et al. 2000, Fehrenbach 2001b, Kim et al. 2005, Kim 2007).

Surfactant hält die Alveolen und Bronchiolen offen. Die hydrophoben SP-B und SP-C sowie das Dipalmitoylphosphatidylcholin erfüllen die biophysikalische Funktion in der alveolären Stabilität (Reduktion der Oberflächenspannung) und schützen die Alveolen vor dem mechanischen Stress (Griese 1999). Auch SP-A spielt unter anderem eine biophysikalische Rolle, indem es sich an der extrazellulären Transformation des Surfactants beteiligt (Fehrenbach 2001b, Griese 1999). Die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeit-Grenze, die durch die intermolekularen Anziehungskräfte entsteht, führt entsprechend der Young-Laplace-Gleichung zu einer gesteigerten Retraktionsneigung der Alveolen (Fehrenbach 2001b). Je kleiner der Durchmesser der Alveole, desto stärker ihre Tendenz zu kollabieren (=Atelektasenbildung). Der Surfactantfilm auf der wässrigen Hypophase der alveolären Oberfläche senkt die Oberflächenspannung, stabilisiert die Alveolen gegen einen Kollaps während der Expirationsphase, verbessert die pulmonale Compliance und erleichtert dadurch die Entfaltung der Lungen während der Inspirationsphase, sodass weniger muskuläre Arbeit zur Inspiration aufgewendet werden muss.

Surfactant hält die Alveolen sauber. Die hydrophilen SP-A und SP-D stellen eine wichtige Komponente der angeborenen Abwehr dar. SP-A und SP-D gehören zu den Kollektinen, die eine immunmodulatorische Funktion erfüllen und dadurch für eine relative Keimarmut in den Alveolen sorgen (Ochs 2006a, Crouch & Wright 2001, McCormack & Whitsett 2002).

Surfactant hält die Alveolen trocken. Eine gesteigerte alveoläre Oberflächenspannung hat einen erhöhten Druckgradienten vom kapillaren zum alveolären Lumen hin zur Folge und führt bei einem beeinträchtigten Surfactantsystem zu einer alveolären Ödembildung. Surfactant hält somit die Alveolen nicht nur offen und sauber, sondern auch trocken (Ochs 2006a, Weibel 2000, Griese 1999, Fehrenbach 2001b, Clements 1961).

1.5 Keratinozytenwachstumsfaktor

Auf der Suche nach einem epithelspezifischen Wachstumsfaktor isolierten im Jahre 1989 Rubin et al. aus einer Zelllinie humaner embryonaler Lungenfibroblasten einen Wachstumsfaktor, der auf Grund seiner potenten mitogenen Aktivität auf Keratinozyten Keratinozytenwachstumsfaktor (**KGF**) genannt wurde (Rubin et al. 1989). KGF gehört zur

Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren (**FGF**) und wird auch als FGF-7* bezeichnet (Finch et al. 1989).

KGF wird von den mesenchymalen Zellen - in erster Linie von glatten Muskelzellen der Gefäße und den Fibroblasten - synthetisiert (Ware & Matthay 2002). Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der FGF-Familie, die eine Affinität zu mehreren FGF-Rezeptoren (**FGFR**) zugleich besitzen, bindet KGF nur an eine FGFR-2-Variante: FGFR-2-IIIb (Igarashi et al. 1998, Ornitz et al. 1996). Da FGFR-2-IIIb von epithelialen Zellen exprimiert wird, erklärt es die parakrine bzw. autokrine epitheliale Spezifität von KGF (Ware & Matthay 2002, Danilenko 1999, Finch et al. 1989, Werner 1998).

Die Effekte auf T-Zellen, MF sowie auf das Endothel werden vermutlich über unbekannte KGF-Rezeptoren oder indirekt durch KGF-induzierte Faktoren wie z.B. Surfactant vermittelt (Ware & Matthay 2002, Haddad et al. 2003, Fehrenbach et al. 2003). Die Expression von KGF wird durch zahlreiche proinflammatorische Zytokine stimuliert (Brauchle et al. 1994, Chedid et al. 1994). Nach tierexperimenteller ALI bzw. ARDS durch Hyperoxie oder intravenös verabreichtes Bleomycin wird KGF verstärkt exprimiert. KGF spielt in Reparaturvorgängen des Alveolarepithels eine wichtige Rolle (Charaffedine et al. 1999, Adamson & Bakowska 1999, Ware & Matthay 2002), indem er die Proliferation von AE II mit anschließender Differenzierung in AE I stimuliert (Ware & Matthay 2002, Werner 1998, Fehrenbach et al. 1999a).

1.5.1 Pulmonale Protektion durch exogenen KGF

Zahlreiche tierexperimentelle Modelle der akuten Lungenschädigung im Sinne von ALI bzw. ARDS belegten bereits mehrfach den pulmonal-protectiven Effekt von KGF (Ware & Matthay 2002). Der über die Atemwege instillierte KGF schützte die Lungen vor Schädigung durch Bleomycin (Sugahara et al. 1998, Yi et al. 1996), Bestrahlung (Yi et al. 1996), Säureinstillation (Yano et al. 1996), mechanischen Stress** der maschinellen Beatmung (Welsh et al. 2000), Hyperoxie (Panos et al. 1995) und Pseudomonas aeruginosa-Infektion (Viget et al. 2000). KGF förderte in den Zellen des Alveolarepithels die Reparatur des bestrahlungsbedingten DNA-Schadens (Takeoka et al. 1997). Die DNA-Schäden in den Zellen des Alveolarepithels stellen eine der Komponenten der aktinischen Pneumotoxizität dar. Der subkutan applizierte KGF verhinderte pulmonale Schäden durch

* Seit der Identifizierung von FGF-10 (Yamasaki et al. 1996) wird KGF (=FGF-7) auch als KGF-1 und FGF-10 als KGF-2 bezeichnet (Ware & Matthay 2002).

** Auch in einer in-vitro-Untersuchung von Oswari et al. (2001) entwickelten die mit KGF behandelten Zellen des Alveolarepithels eine erhöhte Resistenz gegen mechanischen Stress.

„graft-versus-host-disease“ nach allogener Knochenmarktransplantation (Panoskaltis-Mortari et al. 1998). In allen genannten tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte eine Vorbehandlung mit KGF (Ware & Matthay 2002).

1.5.2 Protektive Mechanismen des exogenen KGF

1.5.2.1 Reparatur des geschädigten Alveolarepithels

Einer der wichtigsten Mechanismen, über den KGF die pulmonal-protektive Wirkung entfaltet, ist die Stimulierung der Proliferation von AE II mit anschließender Differenzierung in AE I (Fehrenbach et al. 1999a, Ulich et al. 1994, Ware & Matthay 2002, Werner 1998). Zahlreiche Autoren beschrieben bereits die maximale pulmonale Protektion durch KGF gegenüber verschiedenen Noxen zum Zeitpunkt der stärksten Hyperplasie von AE II (Ware & Matthay 2002). Die stärkste Ausprägung erreicht die Hyperplasie* der AE II an den Tagen 2 bzw. 3 nach der intratrachealen KGF-Applikation (Ware & Matthay 2002, Ulich et al. 1994, Fehrenbach et al. 1999a). Dieser Prozess entspricht der reaktiven Hyperplasie der AE II, die auch in der frühen Phase von ALI bzw. ARDS beim erwachsenen Menschen als Antwort auf die pulmonale Schädigung entsteht (Bachofen & Weilbel 1982) und die sich während der Resolutionsphase durch eine Apoptose zurückbildet (Bardales et al. 1996). In Rattenlungen bildet sich die KGF-induzierte Hyperplasie von AE II innerhalb von 7 Tagen durch Apoptose bzw. terminale Differenzierung in AE I zurück (Fehrenbach et al. 1999a, Fehrenbach et al. 2000b). KGF stimuliert in Rattenlungen außerdem die Proliferation der Clara-Zellen (Fehrenbach et al. 2002). Diese Proliferation ist allerdings viel milder und schwächer, als die Proliferation der AE II (Ulich et al. 1994). Die im Epithel der Bronchiolen lokalisierten Clara-Zellen synthetisieren verschiedene Surfactantkomponenten. Die Clara-Zellen sind außerdem in die Reparaturvorgänge des Epithels, in den Ionen- bzw. Flüssigkeitstransport und in die Modulierung der pulmonalen Inflammation involviert (Plopper et al. 1992, van Scott et al. 1987, Fehrenbach et al. 2002).

KGF entfaltet den reparativen Effekt nicht nur durch gesteigerte Proliferation von AE II und anschließende Differenzierung in AE I, sondern auch durch erhöhte Mobilität der AE II (Ware & Matthay 2002). Die Migration der AE II entlang des geschädigten Alveolarepithels ist ein Prozess, der für die Reparatur des Alveolarepithels genauso wichtig ist wie die Proliferation von AE II (Fehrenbach et al. 1999a, Werner 1998).

* In normalen Rattenlungen machen AE II nur 4% der Alveolaroberfläche aus (Pinkerton et al. 1992). Fehrenbach et al. (1999a) zeigten, dass AE II am Tag 2 nach der intratrachealen KGF-Instillation bereits 25% und am Tag 3 nach der Behandlung 45% der Alveolarepithels bedeckten. An den Tagen 1 und 7 nach der KGF-Instillation machten AE II nur 5-10% der Alveolaroberfläche aus (Fehrenbach 1999a).

Exogener KGF fördert außerdem durch Neubildung von Alveolen das kompensatorische Lungenwachstum nach einer Pneumonektomie in Ratte (Kaza et al. 2002).

1.5.2.2 Stimulierung des Surfactantsystems

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, über den KGF pulmonal-protectiv wirkt, ist die Stimulierung des endogenen Surfactantsystems. KGF erhöht das Phospholipid- bzw. das Surfactantproteinlevel in vitro und in vivo (Sugahara et al. 1995, Fehrenbach et al. 1999a, Morikawa et al. 2000, Yano et al. 2000). Durch eine Regulierung auf der zellulären Ebene bleibt der Phospholipidpool des Surfactantsystems während der KGF-induzierten Hyperplasie der AE II in Rattenlungen ausbalanciert (Fehrenbach et al. 2003).

1.5.2.3 Stabilisierung der Barrierefunktion

In tierexperimentellen Untersuchungen von Waters et al. (1997) und Welsh et al. (2000) führte KGF zu einer verbesserten Resistenz des Alveolarepithels gegenüber pulmonalen Schädigungen (H_2O_2 , mechanischer Stress) und verhinderte dadurch die Bildung eines Alveolarödems. KGF fördert die $Na^+-K^+-ATPase$ -Aktivität und steigert dadurch den transepithelialen Transport der alveolären Flüssigkeit (Borok et al. 1998, Guery et al. 1997). Auch in einem tierexperimentellen Modell der Lungenschädigung durch *Pseudomonas aeruginosa* führte KGF zu einem verbesserten transepithelialen Transport alveolärer Flüssigkeit (Viget et al. 2000). In den Untersuchungen von Barazzzone et al. (1999) wirkte KGF stabilisierend nicht nur auf Alveolarepithel, sondern auch auf Kapillarendothel.

1.5.2.4 Rekombinanter humaner $\Delta N23$ -trunkierter KGF

In der vorliegenden Arbeit wurde der rekombinante humane N-terminal trunkierte KGF (rHu $\Delta N23$ -KGF, Palifermin*) verwendet. Die Deletion der ersten 23 N-terminalen Aminosäuren führt zu einer Verbesserung der Proteinstabilität (Hsu et al. 2006). Zur Vereinfachung wird in dieser Arbeit auf die Bezeichnung rHu $\Delta N23$ -KGF zugunsten der Abkürzung KGF verzichtet.

* Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Palifermin (s. Tab. 1) stellt den bioaktiven, gereinigten, endotoxinfreien rHu $\Delta N23$ -KGF dar. In Deutschland ist Palifermin auch als ein i.v. Medikament Kepivance® (Biovitrum, Deutschland) für folgende Indikation zugelassen: „Verringerung der Häufigkeit, Dauer und des Schweregrads einer Stomatitis (orale Mukositis) bei Patienten mit hämatologischen Malignomen, die eine myeloablative Radiochemotherapie erhalten, welche mit einer hohen Inzidenz für schwerwiegende Stomatitis einhergeht, und die eine autologe hämatopoetische Stammzelltherapie benötigen“ (Auszug aus der Mitteilung von Biovitrum, April 2010, www.bfarm.de). Orale Mukositis ist eine häufige und schwerwiegende Komplikation der Konditionierungsphase in der Therapie verschiedener hämatologischer Malignome. Die Konditionierung (Hochdosischemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung) findet vor der eigentlichen Stammzelltherapie statt (Beaven & Shea 2006, McDonnell & Lenz 2007).

1.6 Stereologie als Methode der quantitativen Analyse

1.6.1 Geschichtliches & einige Grundgedanken

Die Stereologie (griech. „stereós“ - räumlich, „lógos“ - Lehre) als eine offiziell anerkannte interdisziplinäre Wissenschaft über die räumliche Interpretation der 2-dimensionalen Proben existiert erst seit 1961 (Mouton 2005, Mouton 2002). Ihre Anfänge lassen sich jedoch bis in die Antike zurückverfolgen („Euclidean geometry“, Mouton 2005). Sie stellt das Ergebnis einer effizienten Mischung aus Integralgeometrie bzw. stochastischer Geometrie, geometrischer Wahrscheinlichkeit und Statistik dar (Santaló 1976, Stoyan et al. 1995, Kendall & Moran 1963, Miles & Davy 1976, Miles & Serra 1978, Baddeley 1993, Voss 2007, Hsia et al. 2009).

Einen wichtigen Grundstein in der Entwicklung der Integralrechnung legte 1635 ein Schüler von Galileo Galilei - B.F. Cavalieri (Mouton 2005). Seine Idee das Volumen eines nicht-klassisch geformten Objektes anhand der Schnittflächen zu ermitteln, wurde zu einem wichtigen Prinzip, das in der Stereologie bis heute seine Aktualität behält (Hsia et al. 2009, Howard & Reed 1998, Roberts et al. 2000). Die im Jahre 1777 veröffentlichte Arbeit von Graf G.L.M. Buffon („Buffonsches Nadelproblem“, Voss 2007) stellte einen weiteren grundlegenden Schritt in der Entwicklung der Integralgeometrie dar (Howard & Reed 1998, p. 36; Hsia et al. 2009, p. 397). Auf der Basis des Buffonschen „Nadelproblems“, das die geometrische Variante des wahrscheinlichkeits-theoretischen Glücksspiels darstellte, entstanden im Laufe des 19. Jahrhunderts durch die wissenschaftlichen Beiträge der Mathematiker A.L. Cauchy, J. Steiner und M. Crofton die Grundlagen für die Integralgeometrie und die geometrische Wahrscheinlichkeit von heute. Diese zwei eng miteinander verbundenen Disziplinen bildeten das mathematische Fundament der modernen Stereologie (Voss 2007, Mouton 2005).

Die praktische Anwendung der Integralgeometrie im 19. Jahrhundert beschäftigte in erster Linie die Mineralogen. Sie suchten nach einer Methode, mit der man den Volumenanteil eines Minerals in einem Gestein quantifizieren konnte. Im Jahre 1847 zeigte A. Delesse, dass die Volumendichte V_v^* eines in einem Gestein enthaltenen Minerals gleich der Flächendichte A_Λ dieses Minerals in Steinanschliffen** war: $V_v = A_\Lambda$ (Dunnill 1962, Howard & Reed 1998, Voss 2007, Hsia et al. 2009).

* In der Stereologie werden die Dichten eines Strukturparameters in seinem Referenzraum gewöhnlich mit 2 Buchstaben gekennzeichnet - z. B. V_v für die Volumendichte, A_Λ für Flächendichte etc.. Die Volumendichte V_v (Syn.: „volume density“, „volume ratio“, Volumenfraktion, Volumenanteil) ist eine dimensionslose Größe, die von 0 bis 1 betragen kann. Sie wird demzufolge in % oder ohne Maßeinheit angegeben (Howard & Reed 1998, p. 55).

** Die Auswahl der auszuwertenden Schnittflächen folgte dem Zufallsprinzip (Howard & Reed 1998).

Im Jahre 1898 zeigte A. Rosiwal, dass die Volumendichte eines Minerals sich aus der Längendichte L_L dieses Minerals in den Steinanschliffen bestimmen lässt und erweiterte die Formel von A. Delesse: $V_V = A_A = L_L$ (Rosiwal 1898, Dunnill 1962, Howard & Reed 1998). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts stellten E. Thomson und A.A. Glagolev fest, dass die Volumendichte eines in einem Gestein verteilten Minerals durch ein Punktzählverfahren* bestimmt werden kann. Die Formel von A. Delesse und A. Rosiwal wurde noch einmal erweitert: $V_V = A_A = L_L = P_P$ (Thomson 1930, Glagolev 1934, Baddeley & Vedel Jensen 2005, Howard & Reed 1998).

Im Zuge des technischen Fortschrittes im Bereich der Mikroskopie in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts interessierten sich für die Quantifizierung der 3-dimensionalen Objekte immer mehr Biologen und Mediziner. In der Biologie sowie in der Medizin wird man als Wissenschaftler gewöhnlich mit nicht-klassisch geformten Objekten sowie mit inhomogen verteilten Strukturen konfrontiert. Sollte die Anzahl bestimmter Zellen in einem Organ bestimmt werden, ist es verständlich, dass es immens viel Zeit benötigen würde, um diese Zellen eine nach der anderen zu zählen. Es müssen Stichproben genommen werden. Wenn von einer Region in diesem Organ, in der die zu quantifizierenden Strukturen gehäuft vorkommen, häufiger Stichproben genommen werden, als von den übrigen Regionen des Organs, kommt man zu einem Ergebnis, das „biased“** und somit nicht valide ist (Howard & Reed 1998). Man stellte sich die entscheidende Frage nach einer solchen Stichprobennahme, die für das ganze Organ repräsentativ wäre.

In den 70-er Jahren schlossen sich der Internationalen Gesellschaft für Stereologie Mathematiker an und entwickelten als Antwort auf die Frage nach einer repräsentativen Stichprobennahme („sampling“) mathematisch bzw. statistisch robuste und klare „sampling-designs“, die schließlich das Fundament der „unbiased“ (=„design-based“) Stereologie bildeten (Matheron 1972, Miles & Davy 1976, Cruz-Orive & Weibel 1981, Mouton 2005, s. auch 1.6.2.1). Die Stichprobennahme sollte demnach so gestaltet werden, dass jede Region des zu untersuchenden Organs die gleiche Chance hätte, in die Gesamtanalyse einzugehen (Fehrenbach & Ochs 1998, Stuart 1984). Das Prinzip der Chancengleichheit, dass auf jeder Ebene der Stichprobennahme befolgt bzw. eingehalten werden musste, wurde als „uniform randomness“ (=einheitliche Zufallszuteilung) bezeichnet und bekam in der „design-based“ Stereologie einen essentiellen Stellenwert („take a sweet, any sweet“, Howard & Reed 1998, p. 21; Stuart 1984).

* Die Ermittlung der Volumendichten in der vorliegenden Dissertation erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Punktzählverfahrens („point counting“, s. Abb. 2, 3).

** Bias (engl.) – (math.) systematischer Fehler; (ugs.) Bevorzugung, Voreingenommenheit.

Das in die einheitliche Zufallszuteilung („uniform random sampling“) integrierte systematische Vorgehen ergab schließlich „systematic uniform random sampling“ (**SURS**) - das unabdingbare Instrument in der Hand der „design-based“ Stereologie (Miles & Davy 1976, Mayhew 1991, Fehrenbach & Ochs 1998, Howard & Reed 1998, p. 26). Die Stichprobennahme nach dem SURS-Prinzip gewährleistete, dass jede Region der Lunge mit gleicher Wahrscheinlichkeit („uniform randomness“) in die Gesamtauswertung einging und garantierte somit Endergebnisse, die repräsentativ für das Gesamtorgan und nicht nur für die jeweilige Stichprobe waren (Hsia et al. 2009, Fehrenbach & Ochs 1998, Stuart 1984). Das SURS-Prinzip lieferte außerdem nicht nur mathematische Validität, sondern reduzierte die Variabilität, erhöhte somit die Zuverlässigkeit und vereinfachte zudem den Prozess der Stichprobennahme in praktischer Hinsicht (Gundersen & Jensen 1987, Cochran 1977). Auf diese Weise entstand die statistisch geprägte „design-based“ Stereologie, die auf keine Annahmen bezüglich der Form, der Größe oder der Verteilung der zu untersuchenden Objekte mehr angewiesen war („assumption- & model-free approach“, Matheron 1972, Miles & Davy 1976, Fehrenbach & Ochs 1998, Hsia et al. 2009).

1.6.2 „Design-based“ Stereologie

Die Quantifizierung in der Mikroskopie mit Hilfe der „design-based“ Stereologie besteht gewöhnlich aus 2 grundlegenden Schritten: (1) Der statistisch korrekten Stichprobennahme und (2) der eigentlichen stereologischen Analyse der Stichprobe mit einem geeigneten geometrischen Testsystem (s. 2.3.4). Dabei darf die Relevanz des 1. Schrittes - der Stichprobennahme - nicht unterschätzt werden (Howard & Reed 1998, Fehrenbach & Ochs 1998, Ochs 2006a, Weibel 1990, Weibel 1963, Hsia et al. 2009).

1.6.2.1 Design & Prinzipien der Stichprobennahme

Das in der Stereologie verwendete Design der Stichprobennahme stellt in seiner Form eine hierarchisch aufgebaute Pyramide mit mehreren Ebenen dar (z.B.: Lunge als gesamtes Organ → Gewebeblöcke → Gewebeschnitte → lichtmikroskopische Sichtfelder/Level I → lichtmikroskopische Sichtfelder/Level II (s. Abb.1); Howard & Reed 1998, p. 7). Auf jeder Ebene dieser Pyramide muss das SURS-Prinzip befolgt werden („unbiasedness at all levels“, Hsia et al. 2009).

* Unbiasedness (engl., Syn.: trueness, validity, accuracy of the mean) – Validität, Richtigkeit, Gültigkeit der gewonnenen Daten (Röhrig et al. 2009, Hsia et al. 2009). Bias (engl.) – (math.) systematischer Fehler; (ugs.) Bevorzugung, Voreingenommenheit.

Gemäß dem SURS-Prinzip erfolgt die Festlegung der Position der 1. Stichprobe zufällig. Um die darauf folgenden Stichprobenpositionen zu bestimmen, geht man anschließend systematisch vor. Dazu wird ein konstanter Abstand zwischen den 2 aufeinander folgenden Stichproben eingehalten, wodurch die Positionen der 2., der 3. etc. Stichproben ebenso zufällig zustande kommen. Jede Region der Lunge hat auf diese Weise die gleiche Chance („uniform randomness“, Howard & Reed 1998, p. 21) in die Gesamtanalyse einzugehen (Ochs 2006, Mayhew 1991, Cruz-Orive & Weibel 1981, Weibel 1990, Gundersen & Jensen 1987, Fehrenbach & Ochs 1998 Hsia et al. 2009).

1.6.2.2 Gewebeaufbereitung & systematischer Fehler

Auch die Gewebeaufbereitung trägt in der „design-based“ Stereologie (s. 2.2.4) bezüglich der Validität der gesamten Untersuchung einen absolut fundamentalen Charakter (Ochs 2006a, Hsia et al. 2009, Howard & Reed 1998).

Durch die speziell für die stereologische Analyse der Lungen konzipierte Gewebeaufbereitung (intravasale Perfusionsfixierung durch glutardialdehydhaltige Lösung; Einbettung in Agar-Agar; Nachfixierung durch Osmiumtetroxid und Uranylacetat; Entwässerung durch Aceton; Einbettung in Kunststoff statt in Paraffin; Hsia et al. 2009, p. 400; Fehrenbach & Ochs 1998, s. auch Tab. 3) kann das Lungengewebe vor der ungleichmäßigen Schrumpfung*, der mechanischen Verformung während des Schneidens bzw. vor der Zellschwellung geschützt werden. Dies minimiert den damit verbundenen systematischen Fehler („technical bias“, Ochs 2006a, Howard & Reed 1998).

1.6.2.3 Semidünne Lungenschnitte & systematischer Fehler

Das Konzept der Extrapolierung von dem 2-dimensionalen zum 3-dimensionalen Raum mit Hilfe der durch das Punktzählverfahren („point counting“, s. Abb. 2, 3) ermittelten Volumendichten beruht auf dem Prinzip von A. Delesse bzw. E. Thomson und A.A. Glagolev (Baddeley & Vedel Jensen 2005, Howard & Reed 1998, Thomson 1930, Glagolev 1934).

* Da diese Art der Schrumpfung die Gewebekomponenten der Lunge in unterschiedlichen Graden trifft („differential shrinkage“), ist eine rechnerische Korrektur der Endergebnisse nicht möglich. Die globale Schrumpfung dagegen, die alle Komponenten des Organs im gleichen Maße betrifft, kann rechnerisch korrigiert werden. Die globale Schrumpfung wurde durch die speziell für die stereologische Analyse der Lungen konzipierte Gewebeaufbereitung minimiert (Ochs 2006a, Howard & Reed 1998, Hsia et al. 2009, Fehrenbach & Ochs 1998).

Soll dieses Prinzip in der Ermittlung der Volumendichten seine Gültigkeit bewahren und ein valides Ergebnis liefern, müssen die zu analysierenden Lungenschnitte möglichst dünn sein. Andernfalls kommt es zu einer Übereinanderlagerung von Strukturen, die zu einer systematischen Fehlschätzung der Volumendichten führt („over-projection & systematic overestimate“, Howard & Reed 1998, pp. 63-64; Miles & Davy 1976).

Die Einbettung der Lungen in Kunststoff (s. Tab. 3, Fehrenbach & Ochs 1998) macht die Anfertigung von 2 µm dünnen Lungenschnitten möglich. Eine systematische Übereinanderlagerung von Strukturen und demzufolge eine Fehlschätzung der Volumendichten kann dadurch minimiert werden.

1.6.2.4 Absolutes Lungenvolumen & „reference trap“

Die Relevanz des Referenzraumes in der Stereologie kann nicht zu oft betont werden. „Never ever not measure the reference space“ sagte einmal im Bezug auf die stereologische Analyse biologischer Systeme der dänische Stereologe H.J. Gundersen (Braendgaard & Gundersen 1986, Howard & Reed 1998).

Eine Geschichte aus dem Bereich der Neurowissenschaften stellt ein Paradebeispiel von „reference trap“ („trap“ (engl.) – Falle) dar und zeigt zu welcher Fehlinterpertation eine isolierte Betrachtung der stereologischen Dichten führen kann. Mehrere Jahrzehnte wurden der Erforschung des angeblich progredienten Verlustes an Neuronen im Gehirn des alternden Menschen gewidmet. Die Dichten wurden dabei durchweg ohne einen Bezug auf den Referenzraum, d.h. auf das absolute Volumen der zu untersuchenden, noch nicht fixierten Gehirne betrachtet. Erst im Jahre 1984 fand die Arbeitsgruppe von H. Haug heraus, dass die Gehirne junger Menschen im Vergleich zu den Gehirnen älterer Menschen während der Fixierung in Formalin insgesamt mehr schrumpften. Als in die Interpretation der Dichten die Betrachtung der Referenzräume, d.h. der absoluten Volumina der Gehirne, miteinbezogen wurde, stellte sich heraus, dass der Verlust der Neurone im Prozess des Alterns minimal war (Haug et al. 1984, Howard & Reed 1998, Mouton 2005).

Der britische Stereologe T.M. Mayhew fasste die Relevanz des Referenzraumes in seiner Arbeit über die stereologischen Methoden und ihre Rolle in der Interpretation der funktionellen Morphologie folgendermaßen zusammen: „This review emphasizes that stereology is ideal for measuring 2-D images and abstracting 3-D information from them. Emphasis is given to absolute quantities because these avoid the dangers prevalent when comparing groups using relative data. Such comparisons will only be meaningful biologically if the reference space does not vary between groups. Otherwise, there is the danger of misinterpretation due to the reference trap“ (Mayhew 1991, p. 640).

Sollte die Bestimmung der absoluten Volumina der Lungen und somit des stereologischen Basisreferenzraumes vor der Gewebeaufbereitung und der Stichprobennahme ausbleiben, können die stereologisch ermittelten Dichten am Ende der Auswertung nicht korrekt interpretiert werden (s. 2.2.4.2, 2.3.2; Mayhew 1991, Casley-Smith 1988, Howard & Reed 1998, p. 15).

1.6.3 Strukturelemente der Lunge - unterschiedliche Definitionen von Stereologen & Anatomen

Die Definition des Begriffes „PARENCHYMA“ in der Stereologie der Lunge stimmt mit der anatomischen Definition des Lungenparenchyms grundsätzlich nicht überein.

Die Anatomen verstehen unter dem Parenchym das der spezifischen Funktion des Organs dienende Organgewebe und unterscheiden es vom Stoma, dem stützenden interstitiellen Bindegewebe. Die Stereologen müssen das zu untersuchende Organ grundsätzlich in Referenzräume und Strukturparameter unterteilen. Aus praktischen Erwägungen schließt das stereologisch definierte „PARENCHYMA“, ob als Strukturparameter (Level I) oder Referenzraum (Level II), nur die für den unmittelbaren Gasaustausch zuständigen Lungenabschnitte als Ganzes ein (s. Abb. 1). So beinhaltet das stereologisch definierte „PARENCHYMA“ im Gegensatz zum anatomisch definierten Parenchym auch die Alveolarluft („air space“) und das alveoläre Ödem („alveolar edema“). Der restliche Teil des Referenzraumes „PARENCHYMA“ wurde in der vorliegenden Arbeit in die Strukturparameter „septal tissue“ und „capillary lumen“ eingeteilt (s. Abb.1).

Das absolute Referenzvolumen der gesamten Lunge spielt dabei eine Schlüsselrolle. Da Volumendichten $V_V(\text{Strukt}, \text{Ref})$ einen inhärenten Bezug auf ein Referenzvolumen, letztlich auf das Gesamtvolumen der Lunge, aufweisen (zu „reference trap“ s. 1.6.2.4), dürfen keine der Bestandteile des Ganzen, d.h. des jeweiligen Referenzraums (s. Abb.1) ignoriert werden. Eine ausführliche Übersicht über die Aufteilung der Referenzräume in Strukturparameter in der „design-based“ Stereologie der Lunge geben folgende Arbeiten: Fehrenbach et al. 1999b p. 86; Ochs 2006a p. 192; Hsia et al. 2010 pp. 405-181; Weibel 1990 pp. 228-231.

Da es bei dem stereologisch definierten „PARENCHYMA“ ausschließlich um die für den unmittelbaren Gasaustausch zuständigen Lungenabschnitte geht, werden die luftleitenden Wege (einschließlich Bronchioli terminales) mit anliegenden Gefäßen und Bindegewebsstrukturen zu dem stereologisch definierten „NON-PARENCHYMA“ (s. auch Abb. 1, 2) gerechnet.

Auch unter dem Strukturparameter „septal tissue“ (s. auch 4.3.2.2; Abb. 1, 3) wird dabei nicht nur das wenige interstitielle Stütz- und Bindegewebe der für den Gasaustausch zuständigen Lungenabschnitte zusammengefasst, sondern auch die AE I, AE II, die Kapillarwände und der Raum dazwischen, der die miteinander verschmolzenen Basalmembranen beinhaltet.

E.R. Weibel schrieb in einer seiner Arbeiten über die Stereologie der Lunge: „...the gas exchange structures are concentrated in the *alveolar septum*, which is decomposed into capillaries and tissue barrier. Septa, air in alveoli, and alveolar ducts taken together are defined as *lung parenchyma*. We lump into the term *nonparenchyma* all other components, such as major airways (from large bronchi to bronchioles), blood vessels larger than capillaries, thicker connective tissue septa, and the pleura“ (Weibel 1990 p. 228).

Schließlich ist es eine Sache der Bezeichnung und der Definition, die in der Stereologie bereits vor Jahrzehnten etabliert wurden.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war es zu prüfen, ob im Zuge einer isogenen LTx eine intratracheale Vorbehandlung des Spenders mit KGF in der Lage ist, den transplantationsassoziierten I&R-Schaden günstig zu beeinflussen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde als wesentlicher Endpunkt die Menge an alveolärem Ödem definiert, die mit Hilfe der „design-based“ Stereologie quantifiziert werden sollte.

Mit Hilfe der Immunhistologie sollte zusätzlich der mögliche Einfluss von KGF auf das Ausmaß der Infiltration durch alveoläre und peribronchovaskuläre MF sowie durch T-Lymphozyten untersucht werden.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien, Reagenzien, Medikamente & Pufferlösungen

Tab. 1 Materialien, Reagenzien & Medikamente

Material/Reagenz/Medikament		Hersteller	Best.-Nr.
Abbocath® 16 GA (i.v. Katheter)		Abbott, Sligo, Irland	
Aceton p.a.		Merck, Darmstadt, DE	1.00014
Agar-Agar		Division Chroma®, Münster, DE	202519
Ampicillin-ratiopharm® (Ampicillin-Natrium, 0,53 g Trockensubstanz)		Merckle GmbH, Blaubeuren, DE	
Antikörper, monoklonal:	ED1	Serotec Ltd,	MCA341R
	ED2	Oxford, Großbritannien	MCA342R
	R73		MCA453G
Antisedan® (Atipamezolhydrochlorid, 5 mg/ml)		Pfizer GmbH, Karlsruhe, DE	
Aqua ad injectabilia		B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE	6874361
Atropinsulfat® (Atropinsulfat, 0,5 mg/ml)		B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE	
Azur II		Merck, Darmstadt, DE	9211
Borax (Dinatriumtetraborat-Decahydrat)		Merck, Darmstadt, DE	1.01273
BSA (Bovines Serumalbumin)		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	11930
Citronensäure-Monohydrat p.a.		Merck, Darmstadt, DE	1.00244
Chloralhydrat		Merck, Darmstadt, DE	1.02425
DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)		Sigma®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	D5905
Deckgläser		Menzel-Gläser, Braunschweig, DE	
Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat		Merck, Darmstadt, DE	8.20670
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.a.		Merck, Darmstadt, DE	1.06580
Domitor® (Medetomidinhydrochlorid, 1 mg/ml)		Pfizer GmbH, Karlsruhe, DE	

ED1	s. Antikörper	
ED2	s. Antikörper	
Entellan® (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie)	Merck, Darmstadt, DE	1.07961
EnVision+®System-HRP (horseradish- -peroxidase) labelled polymer, anti-mouse Essigsäure 100% p.a.	DakoCytomation, Carpinteria, USA Merck, Darmstadt, DE	K4001 1.00063
Ethanol absolut p.a	Merck, Darmstadt, DE	1.00983
Forene® (Isofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE	
Glutaraldehyd 25% (in Wasser)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	23114
Hämatoxylin (Monohydrat)	Merck, Darmstadt, DE	1.15938
Heparin-ratiopharm® (Heparin-Natrium, 5000 IE/ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE	
HEPES-Puffer 1 M (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- -ethansulfonsäure in Wasser)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE	S11-001
Histo-Comp® (Paraffin zum Gewebereinbetten)	Vogel, Gießen, DE	VO-5-100
Insyte® 16 GA (i.v. Katheter)	Beckton Dickinson, Sandy, USA	
Isopropanol p.a.	J. T. Baker, Deventer, Holland	8067
Kalialaun p.a. (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat)	Merck, Darmstadt, DE	1.01047
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt, DE	1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt, DE	1.04873
KGF	s. Palifermin	
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, 100 mg/ml)	Pharmacia GmbH, Erlangen, DE	
Kochsalzlösung, isoton (0,9%)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE	
Methylenblau	Merck, Darmstadt, DE	1283
Monosof® 9-0 (monofil, nicht resorbierbar)	USS DG, Norwalk, USA	
Natriumazid reinst	Merck, Darmstadt, DE	1.06688

Natriumchlorid p.a.	Roth®, Karlsruhe, DE	3957
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat reinst	Merck, Darmstadt, DE	1.06345
Natriumhypochloritlösung	Merck, Darmstadt, DE	1.05614
Natriumiodat p.a.	Merck, Darmstadt, DE	1.06525
Natronlauge 1 M	Merck, Darmstadt, DE	1.09137
Natronlauge 2 M	Merck, Darmstadt, DE	1.09136
Normalrattenserum (hitzeinaktiviert)	Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, DE	
Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, DE	
Osmiumtetroxid 99,9%	Chempur®, Karlsruhe, DE	006051
Palifermin (bioaktiver, gereinigter, endotoxinfreier rHuΔN23-KGF, hergestellt in E. coli)	Amgen, Thousand Oaks, California, USA	
Paraformaldehyd	Sigma®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	P6148
Perhydrol® p.a. (Wasserstoffperoxid 30%)	Merck, Darmstadt, DE	1.07209
Pertex® (Schnelleindeckmittel für histologische Präparate)	Medite GmbH, Burgdorf, DE	PER 30000
Premilene® 8-0 (monofil, nicht resorbierbar)	B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, DE	
Protease Typ XIV (bakteriell aus Streptomyces griseus, 5,2 Einheiten/mg)	Sigma®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	P-5147
R73	s. Antikörper	
Roticlear® (Rotihistol)	Roth®, Karlsruhe, DE	A538
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt, DE	1.09057
Salzsäure 25% p.a.	Merck, Darmstadt, DE	1.00316
Seide 6-0 (geflochten, nicht resorbierbar)	Resorba, Nürnberg, DE	
Silan ((3-Aminopropyl)triethoxysilan)	Sigma®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	A3648
Technovit® 7100 Kombipackung	Heraeus Kulzer GmbH &	64709003

(kaltpolymerisierender Kunststoff zum Einbetten auf der Basis von Hydroxyethylmethacrylat; bestehend aus Basisflüssigkeit, Härter I und Härter II)	Co. KG, Wehrheim/Ts., DE	
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura, Torrance, USA	
Trizma® Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	T-1503
Uranylacetat	Agar Scientific Ltd., Stansted, Großbritannien	R1260A
VE-Wasser (voll entsalztes Wasser)	Universitätsklinikum Gießen, Gießen, DE	
Vicryl™ 4-0 (geflochten, resorbierbar)	Ethicon, St. Stevens-Woluwe, Belgien	
Wasserstoffperoxid	s. Perhydrol®	
Xylol p.a.	Merck, Darmstadt, DE	1.08685

Tab. 2 Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
HEPES-Puffer 0,15 M pH 7,4	s. Tab. 1
Natrium-Cacodylat-Puffer 0,1 M pH 7,4	100 mM Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat 50 mM Natriumchlorid in Aqua ad injectabilia
PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,2	140 mM Natriumchlorid 3 mM Kaliumchlorid 8 mM di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat in VE-Wasser
Sørensen-Puffer 0,1 M pH 7,4	20 mM Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 80 mM di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in VE-Wasser
TBS (Tris buffered saline) pH 7,6	50 mM Trizma® Base 150 mM Natriumchlorid in VE-Wasser
Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,4	23 mM Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 77 mM di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in VE-Wasser
VE-Wasser – voll entsalztes Wasser	

2.2 Experimentelles Vorgehen

2.2.1 Versuchstiere

Zur Durchführung der isogenen orthotopen linksseitigen LTx wurden männliche Lewis-(LEW(RT1^l))-Inzuchtratten mit einem Gewicht von 200-270 g eingesetzt. Die unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gezüchteten Tiere wurden von der Firma Elevage Janvier (Le Genest St. Isle, Frankreich) sowie von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen.

2.2.2 Behandlung der Transplantatspender

Die Behandlung der Spender erfolgte auf dem Weg der intratrachealen Instillation und fand an den Tagen 3* und 2* vor der geplanten LTx statt. Die Transplantatspender der Versuchsgruppe wurden mit einer Dosis von 5 mg/kg KG KGF (Palifermin, s. Tab. 1, 1.5.2.4) behandelt. Die Konzentration der KGF-Lösung lag bei 5 mg KGF pro 1 ml PBS. In den Transplantatspendern der Kontrollgruppe führte man die Behandlung mit äquivalenten Volumina (200-270 µl) PBS durch.

2.2.3 Lungentransplantation bei der Ratte

Die Lungen der Ratten wurden in Anlehnung an die Methode von Mizuta et al. (1989) von Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau transplantiert (Schmidt et al. 2007).

Die mit Forene[®] inhalativ vornarkotisierten Spender- sowie Empfängertiere bekamen eine intramuskuläre Atropinsulfat[®]-Injektion (0,25 mg/kg KG). Anschließend wurde den Tieren intraperitoneal Ketavet[®] (90 mg/kg KG) und Domitor[®] (0,1 mg/kg KG) in 500 µl isotoner Kochsalzlösung injiziert. In Narkose wurden die Tiere mit einem 16 GA Insyte[®]-Katheter orotracheal unter Sicht intubiert und an ein Kleintierbeatmungsgerät (Harvard Rodent Small Animal Ventilator 683, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen. Die Beatmung erfolgte bei einem positiven endexpiratorischen Druck von 5 cm H₂O mit einer Frequenz von 100 Atemzügen/min und einem Atemzugvolumen von 2,5 ml Raumluft. Bei Spendertieren folgte eine intravenöse Heparin-ratiopharm[®]-Injektion (1000 IE/kg KG).

Der Spender wurde in Rückenlage fixiert. Im Anschluss an die Desinfektion der Haut über dem Operationsgebiet erfolgte die Eröffnung des Zwerchfells über einen transabdominalen Zugang und eine mediale Thorakotomie. Man durchtrennte die Vena cava inferior sowie

* Da der höchste pulmonal-protective Effekt 2-3 Tage nach KGF-Applikation erreicht wird (Ware & Matthay 2002), bedeutete dies für das experimentelle Design der vorliegenden Arbeit eine Behandlung der Spendertiere 2-3 Tage vor der LTx.

die Aorta abdominalis und perfundierte die Lungen für 2 min mit 20 ml 4° C kalter isotoner Kochsalzlösung bei einem hydrostatischen Druck von 20 cm H₂O über einen Katheter, der über den rechten Ventrikel in den Truncus pulmonalis vorgeschoben wurde. Das Perfusat floss durch eine Inzision im linken Vorhof ab. Anschließend ligierte man die Trachea, während die Lungen sich in Inspirationsstellung befanden. Nach dem Durchtrennen der Trachea wurde das Herz-Lungenpaket des Spenders entnommen und in einer Schale mit 4° C kalter isotoner Kochsalzlösung für die weitere Präparation und bis zur Implantation gelagert. Die weitere Präparation erfolgte unter einem Operationsmikroskop. Dabei wurde der linke Stammbronchus ligiert und hilumnah abgesetzt. Die Enden der Arteria pulmonalis sinistra und der Vena pulmonalis sinistra wurden jeweils durch einen Anastomosencuff durchgezogen, umgestülpt und mit Premilene® 8-0 fixiert. Die Anastomosencuffs, die jeweils aus einem Abbocath®-Katheter in Form einer Manschette (16 GA x 2 mm) geschnitten wurden, erleichterten das Anastomosieren der Pulmonalgefäße der Ratte (Mizuta et al. 1989).

Der Empfänger wurde in Rechtsseitenlage fixiert. Die linke Thoraxhälfte wurde rasiert und anschließend desinfiziert. Es folgte eine laterale Thorakotomie in Höhe des 4. linken Interkostalraumes. Zwischen der 3. und der 4. Rippe wurde ein Spreizer eingesetzt. Die Präparation des Lungenhilums erfolgte unter einem Operationsmikroskop. Dabei ligierte man den linken Bronchus, setzte ihn hilumnah ab, ligierte die Arteria pulmonalis sinistra und anschließend die Vena pulmonalis sinistra herznah. Die ligierten Pulmonalgefäße des Empfängers wurden hilumnah in Längsrichtung inzidiert und mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Die mit Anastomosencuffs versehenen Pulmonalgefäße des Spenders wurden durch Inzisionen in Pulmonalgefäße des Empfängers eingeführt und mit Seide 6-0 fixiert. Man entfernte die linke Lunge des Empfängers. Der Transplantatbronchus wurde mit dem Empfängerbronchus per End-zu-End-Anastomose mit Monosof® 9-0 vernäht. Danach verlagerte man das reventilierte und reperfundierte Lungentransplantat in die Pleurahöhle des Empfängers. Vor dem Verschluss der Thoraxwand wurde das Lungentransplantat kurzzeitig gebläht. Anschließend legte man in die Pleurahöhle als Drainage einen perforierten Silikonschlauch. Die Thoraxwand wurde in drei Schichten mit Vicryl™ 4-0 verschlossen. Anschließend wurde an die Drainage ein leichter Unterdruck angelegt und der positive endexpiratorische Druck auf etwa 1 cm H₂O vermindert. Die Empfänger bekamen eine intraperitoneale Ampicillin-ratiopharm®-Injektion (150 mg/Versuchstier). Zur Antagonisierung der Narkose injizierte man den Empfängern subkutan Antisedan® (0,5 mg/kg KG) und entfernte nach dem Wiedereinsetzen der Spontanatmung die Drainage. Die Tiere bekamen kein Immunsuppressivum.

Die Ischämiezeiten wurden an das Konzept der Lobar-Lebendspende („living donor lobar lung transplantation“, **LDLLT**) angepasst und möglichst kurz gehalten (Date et al. 2003, Kozower et al. 2006). Die maximale warme Ischämiezeit lag unter 20 min und die maximale kalte Ischämiezeit unter 25 min. Die Entnahme der Herz-Lungenpakete erfolgte 24 Stunden nach der LTx. Dazu wurden die Empfänger durch Inhalation einer letalen Dosis Forene® eingeschläfert.

2.2.4 Gewebeaufbereitung für die Stereologie

2.2.4.1 Intravasale Perfusionsfixierung

Die Fixierung erfolgte zunächst in situ auf dem Weg der intravasalen Perfusion. Dazu wurden die Lungen unmittelbar vor der Explantation der Herz-Lungenpakete mit 20 ml isotoner Kochsalzlösung über einen Katheter im Truncus pulmonalis gespült und anschließend für 20 min bei einem hydrostatischen Druck von 15 cm H₂O und einem konstanten Atemwegsdruck von 12 cm H₂O mit einem Fixativ aus 1,5% Glutardialdehyd, 1,5% Paraformaldehyd in 0,15 M HEPES-Puffer perfundiert (s. auch 1.6.2.2). Das Perfusat wurde über einen Katheter im linken Vorhof ausgeleitet. Anschließend ligierte man die Trachea und entnahm das Herz-Lungenpaket, das anschließend im gleichen Fixativ, freischwebend und unter dem Flüssigkeitsniveau bei 4° C für 24 h gelagert wurde (Fehrenbach & Ochs 1998, Weibel 1990, Bachofen et al. 1982). Der Fixierung folgte die Ermittlung der absoluten Lungenvolumina.

2.2.4.2 Ermittlung der absoluten Lungenvolumina

Die Volumenmessung der Rattenlungen erfolgte nach der Methode der Flüssigkeitsverdrängung von Scherle (1970) und beruht auf dem Archimedischen Prinzip. Die Lungen wurden vor der Volumenmessung sorgfältig von den anhängenden Strukturen freipräpariert. Um die Lunge vollständig unter das Flüssigkeitsniveau zu bringen, benutzte man eine Pinzette, die mittels eines starren Drahtes an einem Stativ in konstanter Höhe befestigt war. Dabei durfte weder die Pinzette noch die Lunge die Gefäßwände berühren (Scherle 1970, Weibel 1990, Fehrenbach & Ochs 1998).

Das Lungenvolumen V_{LUNG} [mm³] wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$V_{\text{LUNG}} = V_{\text{verdrängte Immersionsflüssigkeit}} = \frac{(W_2 - W_1)}{G_{\text{Immersionsflüssigkeit}}} \quad [\text{mm}^3]$$

Um das Gewicht W_1 [g] zu ermitteln, wurde das mit Wasser (=Immersionsflüssigkeit) nur zum Teil gefüllte Gefäß samt eingetauchter Pinzette auf einer Analysenwaage gewogen. Danach brachte man mit Hilfe der Pinzette die Lunge komplett unter das Niveau der Immersionsflüssigkeit und ermittelte so das Gewicht W_2 [g]. Aus der Differenz der Gewichte ($W_2 - W_1$) [g] und dem spezifischen Gewicht G des Wassers* [g/mm^3] berechnete man das absolute Volumen der durch die Lunge verdrängten Immersionsflüssigkeit und somit das absolute Volumen der Lunge. Anschließend wurden die Lungen in 2% Agar-Agar in Leitungswasser eingebettet. Dies ermöglichte ein gleichmäßiges Schneiden der Lungen ohne das Gewebe zu komprimieren (s. 1.6.2.2).

Das Gesamtvolumen der fixierten Lunge stellte jeweils den Basisreferenzraum dar (s. auch Abb. 1). Anhand des absoluten Volumens des Referenzraumes V_{LUNG} und der Volumendichten der untersuchten Strukturparameter $V_v(\text{Strukt}, \text{Ref})$ wurden die absoluten Volumina der untersuchten Strukturparameter $V(\text{Strukt})$ errechnet und auf die Körpergewichte der entsprechenden Spendertiere bezogen. Auf diese Weise wurden die massenspezifischen Volumina (**MSV**) der untersuchten Strukturparameter ermittelt (s. auch 2.3.2, 3.1.2).

2.2.4.3 Gewinnung und Aufbereitung der Lungenproben

Mit Hilfe eines für die stereologische Stichprobengewinnung konzipierten Gerätes (Fehrenbach & Ochs 1998, Howard & Reed 1998) wurden die in Agar-Agar eingebetteten Lungen von apikal nach kaudal in 4 mm dicke parallele Transversalscheiben geschnitten. Die 1. Schnittposition kam gemäß dem SURS-Prinzip (s. 1.6.2.1) zufällig zustande und lag innerhalb der ersten 4 mm. Um die darauf folgende Schnittposition zu bestimmen, ging man anschließend systematisch vor. Dazu wurde der konstante Abstand (4 mm) zwischen den Schnittpositionen eingehalten, wodurch die 2., die 3., etc. Schnittpositionen ebenso zufällig zustande kamen. Die Transversalscheiben wurden nach dem speziell für die stereologische Analyse der Lungen konzipierten Vorgang fixiert und in Kunststoff eingebettet (Fehrenbach & Ochs 1998, Bachofen et al. 1982; s. 1.6.2.2, 1.6.2.3, Tab. 3).

* Das spezifische Gewicht von Wasser beträgt bei Raumtemperatur $0,001 \text{ g}/\text{mm}^3$.

Tab. 3 Aufbereitung der Lungen für die Stereologie

Vorgang	Reagenzien & Bedingungen
<u>Waschen</u>	(1) 0,15 M HEPES-Puffer (s. Tab. 1), 2 x 10 min, RT (2) 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer, 4 x 5 min, RT
<u>1. Nachfixierung</u>	1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer 1 x 2 h, RT
<u>Waschen</u>	(1) 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer, 4 x 5 min, RT (2) Aqua ad injectabilia, ca. 1 h, RT
<u>2. Nachfixierung</u>	50% Uranylacetat in Aqua ad injectabilia ü.N., RT
<u>Waschen</u>	Aqua ad injectabilia ca. 1 h, RT
<u>Entwässerung</u>	(1) 70% Aceton in Aqua ad injectabilia, 2 x 1 h, RT (2) 90% Aceton in Aqua ad injectabilia, 2 x 1 h, RT (3) 100% Aceton, 1 x 1 h, RT
<u>Einbettung in Kunststoff</u>	Die Lungenscheiben wurden gemäß dem SURS-Prinzip (s. auch 1.6.2.1) stets mit der gleichen Seite* nach oben in die Einbettkassetten positioniert und in Technovit® 7100 (=kaltpolymerisierender Kunststoff auf der Basis von Hydroxyethylmethacrylat bestehend aus Basisflüssigkeit, Härter I und Härter II) wie folgt eingebettet: (1) Infiltration mit 1:1 mit Aceton verdünnter Infiltrationslösung ü.N., RT Infiltrationslösung = 1 g Härter I + 100 ml Basisflüssigkeit (2) Infiltration mit Infiltrationslösung: ü.N., RT (3) Einbetten: ü.N., RT

HEPES – 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

RT – Raumtemperatur

ü.N. – über Nacht

SURS – „systematic uniform random sampling“

* Zur Einhaltung eines konstanten Abstandes zwischen den Stichproben (s. 1.6.2.1).

Von jedem Lungenkunststoffblöckchen fertigte man mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (R. Jung GmbH, Nussloch, Deutschland) einen 2 µm dünnen Schnitt an. Die Lungenpräparate wurden auf dem Wasserbad gestreckt, auf nicht vorbehandelte Objektträger aufgenommen und für ca. 1 h bei 60° C auf einer Wärmeplatte getrocknet. Anschließend färbte man die Schnitte ca. 30 sec mit der 1:1 mit Leitungswasser verdünnten und ca. 65° C warmen Richardson-Farblösung (0,25% Methylenblau, 0,5% Azur II und 0,22% Borax in Aqua ad injectabilia). Danach wurden die Lungenpräparate in kaltem

Leitungswasser und anschließend in Aqua ad injectabilia gespült. Die gut getrockneten Schnitte tauchte man in Xylol ein. Anschließend folgte die Eindeckung der Lungenpräparate mit Entellan®.

2.2.5 Gewebeaufbereitung für die Immunhistologie

2.2.5.1 Paraffinpräparate

Die entnommenen Herz-Lungenpakete wurden für 1 h bei einem konstanten hydrostatischen Druck von 20 cm H₂O mit einem 4° C kalten Fixativ aus 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Sørensen-Puffer über die Trachea instilliert und anschließend bei 4° C für 24 h frei schwebend unter dem Flüssigkeitsniveau im gleichen Fixativ gelagert. Danach präparierte man die Lungen von anhängenden Strukturen frei, trennte sie voneinander und bettete sie in 1% Agar-Agar in Leitungswasser ein. Die Einbettung in Agar-Agar ermöglichte ein gleichmäßiges Schneiden der Lungen in ca. 3 mm dicke Transversalscheiben ohne das Gewebe zu komprimieren. Die von Agar-Agar frei präparierten Lungenscheiben wurden in 0,1 M Sørensen-Puffer ca. 1 h entgast. Danach wurden sie bei 4° C für 24 h in frischem 0,1 M Sørensen-Puffer und anschließend für 30 min in 50% Isopropanol in voll entsalztem Wasser (**VE**-Wasser) gewaschen. Die Lungenscheiben wurden bis zur Einbettung in Paraffin in 70% Isopropanol in VE-Wasser gelagert und unmittelbar vor der Einbettung in 96% Isopropanol in VE-Wasser überführt. Die Vorgehensweise bei der Einbettung der Lungen in Paraffin wird in der Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4 Einbettung der Lungen in Paraffin

Lösung	Dauer	Temperatur
96% Isopropanol in VE-Wasser	1 h	RT
100% Isopropanol	1 h	RT
100% Isopropanol	1 h	RT
25% Roticlear® (Rotihistol) in Isopropanol	1 h	RT
50% Roticlear® in Isopropanol	1 h	RT
75% Roticlear® in Isopropanol	1 h	RT
100% Roticlear®	1 h	RT
Histo-Comp®(Paraffin)	2 h	60-62° C
Histo-Comp®	ü.N.	60-62° C

VE-Wasser – voll entsalztes Wasser

RT – Raumtemperatur

ü.N. – über Nacht

Die Herstellung der Lungenparaffinblöckchen erfolgte an einer Tissue-Tek®-Ausbettstation (Sakura, Torrance, USA). Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (R. Jung AG, Heidelberg, Deutschland) fertigte man 6 µm dünne Lungenschnitte an, die auf einem Wasserbad gestreckt und auf silanisierte Objektträger (s. Tab. 5) aufgenommen wurden. Danach wurden die Schnitte über 24 h bei 60° C getrocknet und anschließend entparaffiniert (s. Tab. 6).

Tab. 5 Silanisierung der Objektträger

Lösung	Dauer	Temperatur
5% Salzsäure in VE-Wasser	ü.N.	RT
VE-Wasser	5 min	RT
100% Isopropanol	5 min	RT
Trocknen der Objektträger	30 min	RT
2% Silan in Aceton	5 min	RT
2% Aceton in VE-Wasser	5 min	RT
2% Aceton in VE-Wasser	5 min	RT
VE-Wasser	5 min	RT
Trocknen der Objektträger	ü.N.	60° C
VE-Wasser – voll entsalztes Wasser		
ü.N. – über Nacht		
RT – Raumtemperatur		

Tab. 6 Entparaffinierung der Lungenschnitte

Lösung	Dauer	Temperatur
100% Xylol	3 x 10 min	RT
100% Isopropanol	2 x 3 min	RT
90% Isopropanol in VE-Wasser	3 min	RT
80% Isopropanol in VE-Wasser	3 min	RT
70% Isopropanol in VE-Wasser	3 min	RT
50% Isopropanol in VE-Wasser	3 min	RT
VE-Wasser	3 min	RT
TBS	3 min	RT
RT – Raumtemperatur		
VE-Wasser – voll entsalztes Wasser		
TBS – Tris buffered saline		

Der Entparaffinierung der Lungenschnitte folgte die immunhistochemische Färbung (s. Tab. 7).

2.2.5.2 Gefrierpräparate

Vor der Entnahme der Lungen zur immunhistochemischen Färbung (s. Tab. 7) wurden die Transplantatspender in Narkose sternotomiert. Anschließend lavagierte man die Lungen über eine Kanüle in der Trachea. Dabei klemmte man zuerst den rechten Hauptbronchus ab und lavagierte die linke Lunge 5x mit jeweils 2 ml 37° C warmer isotoner Kochsalzlösung. Anschließend klemmte man den linken Hauptbronchus ab und lavagierte die rechte Lunge 5x mit jeweils 3 ml gleicher Lösung. Die so gewonnenen Lavageflüssigkeiten wurden nicht im Rahmen dieser Dissertation untersucht (Sadovski, Kuchenbuch et al. 2008).

Nach der Entnahme der Herz-Lungenpakete wurden die Lungen mit einer 1:1 mit Tissue-Tek®-O.C.T™ Compound gemischten Saccharose-Lösung (9% Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer) intratracheal aufgefüllt. Anschließend wurden die Herz-Lungenpakete in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Die 10 µm dünnen Gefrierschnitte wurden an einem Kryomikrotom (Cryo-Star HM 560 M, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt und auf silanisierte Objektträger (s. Tab. 5) aufgenommen. Die Präparate trockneten ca. 2 h an der Raumluft und wurden anschließend bis zur immunhistochemischen Färbung (s. Tab. 7) bei -20° C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Immunhistochemie wurden die Gefrierpräparate für 10 min in 4° C kaltem 100% Isopropanol fixiert.

2.2.5.3 Immunhistologie

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit Hilfe der etablierten monoklonalen Antikörper: ED1 (CD68-artiges lysosomales Membranantigen), ED2 („hemoglobin scavenger“ Rezeptor CD163) und R73 (ein Epitop der konstanten Determinante der β -Kette des α/β -T-Zell-Rezeptors). Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise während der immunhistochemischen Färbung sowie der darauf folgenden Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgt in der Tab. 7.

Tab. 7 Immunhistochemische Färbung

Paraffinpräparate (entparaffiniert)	Gefrierpräparate
<u>Antigendemaskierung</u> 50 µl 0,05% Protease Typ XIV in TBS pro Lungenschnitt Inkubation in einer Feuchtkammer: 15 min, RT	<u>Fixierung</u> 4° C kaltes 100% Isopropanol 10 min

Spülen mit PBS

Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität

1% Wasserstoffperoxid in PBS

Inkubation: 30 min, RT

Spülen mit PBS

Absättigung der Proteinbindungsstellen

50 µl PBS/BSA/Azid-Lösung (1% BSA und

0,1% Natriumazid in PBS) pro Lungenschnitt

Inkubation in einer Feuchtkammer:

30 min, RT

Anschließend Abschütteln der PBS/BSA/Azid-Lösung

Primärantikörper (ED1, ED2, R73)

50 µl Primärantikörperlösung in PBS/BSA/Azid

pro Lungenschnitt

Paraffinpräparate: ED1 (1/500)

Gefrierpräparate: ED2 (1/200), R73 (1/500)

Die Kontrollen wurden mit äquivalenten Volumina

PBS/BSA/Azid ohne Primärantikörper behandelt.

Inkubation in einer Feuchtkammer:

Paraffinpräparate:

ü.N., 4°C

Gefrierpräparate:

1 h, RT

Spülen mit PBS

Antikörpernachweis

50 µl EnVision+®System-HRP (s. Tab. 1) inkl. 5%

hitzeinaktiviertes Normalrattenserum pro Lungenschnitt

Inkubation in einer Feuchtkammer:

30 min, RT

Spülen mit TBS

Farbreaktion

50 µl DAB-Lösung (5% DAB und

0,012% Wasserstoffperoxid in TBS)

pro Lungenschnitt

Inkubation in einer Feuchtkammer:

10 min, RT

Spülen mit PBS

Die Spüllösung wurde zum Entgiften von DAB in

Chlorbleichlauge aufgefangen.

Spülen mit VE-Wasser

Färbung mit Hämalaun

- (1) Färben in 1:10 mit VE-Wasser verdünnter
Hämalaun-Stammlösung (0,1% Hämatoxylin, 0,02%
Natriumiodat, 5% Kalialaun, 5% Chloralhydrat, 0,1%
Citronensäure in VE-Wasser): ca. 1,5 min
(2) Bläuen mit Leitungswasser: ca. 3 min

Spülen mit VE-Wasser

Entwässerung

- 50% Isopropanol in VE-Wasser, 3 min, RT
70% Isopropanol in VE-Wasser, 3 min, RT
80% Isopropanol in VE-Wasser, 3 min, RT
90% Isopropanol in VE-Wasser, 3 min, RT
100% Isopropanol, 2 x 3 min, RT
100% Xylol, 2 x 3 min, RT

Eindecken mit Pertex® (s. Tab. 1)

TBS – Tris buffered saline (s. Tab. 2)

RT – Raumtemperatur

PBS – Phosphate buffered saline (s. Tab. 2)

BSA – bovines Serumalbumin

HRP – horseradish peroxidase

DAB – 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid

VE-Wasser – voll entsalztes Wasser

ü.N. – über Nacht

2.3 Stereologische Analyse

Die stereologisch-lichtmikroskopische Analyse des alveolären Ödems erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Lungenschnitte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX51; Olympus, Kopenhagen, Dänemark) bei 4x (Level I) und 20x (Level II) Objektivergrößerungen. Das lichtmikroskopische Bild wurde über eine Videokamera auf einen Monitor übertragen und konnte so mittels eines für stereologische Untersuchungen konzipierten Programms (CAST Grid, Visiopharm, Hersholt, Dänemark) bei 170x (Level I) und 850x (Level II) Endvergrößerung online ausgewertet werden (s. Abb. 2, 3).

2.3.1 Ebene der Sichtfelder: Level I & Level II

Die stereologisch-lichtmikroskopische Analyse per Punktzählverfahren („point counting“, s. Abb. 2, 3) fand auf der letzten Ebene (=Ebene der Sichtfelder, s. Abb. 1) der hierarchisch aufgebauten Stichprobennahme (s. 1.6.2.1) statt und wurde in Level I und Level II („multistage stratified sampling/analysis“, Hsia et al. 2009) unterteilt. Dabei setzte die

Analyse auf dem Level II eine stattgefundenene Analyse auf dem Level I voraus (Weibel 1990, Cruz-Orive & Weibel 1981).

Ebene der Sichtfelder (Lichtmikroskopie)

Level I (4x Objektivvergrößerung)

(Basis)referenzraum: LUNG*

Strukturparameter:

- (NON-LUNG)*
- NON-PARENCHYMA*
- PARENCHYMA*

Level II (20x Objektivvergrößerung)

Referenzraum: PARENCHYMA*

Strukturparameter:

- air space
- alveolar edema
- septal tissue
- capillary lumen

Abb. 1 Abfolge der stereologisch-lichtmikroskopischen Analyse

Dargestellt ist die Abfolge der stereologisch-lichtmikroskopischen Analyse. Die Strukturparameter stellen jeweils die Komponenten ihres jeweiligen Referenzraumes dar. Die Level-I-Analyse fand bei 4x Objektivvergrößerung statt. Die Level-II-Analyse erfolgte bei 20x Objektivvergrößerung.

* Die nicht zur Lunge gehörenden Strukturen (z.B. Fettgewebe, Perikard, Blutgerinnsel etc.), die man bei der Präparation der Lungen vor der Ermittlung der absoluten Volumina (s. auch 2.2.4.2) mit bloßem Auge nicht erkannte, wurden im Rahmen der Level-I-Analyse (s. Abb. 2) als „NON-LUNG“ quantifiziert und von der Gesamtanalyse rechnerisch ausgeschlossen. „NON-PARENCHYMA“ beinhaltete Pleura visceralis, luftleitende Wege einschließlich Bronchioli terminales mit anliegenden Gefäßen und Bindegewebsstrukturen. Das stereologisch definierte „PARENCHYMA“ (s. auch 1.6.3) umfasste dabei nur die für den unmittelbaren Gasaustausch (Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares und Alveoli) zuständigen Lungenabschnitte als Ganzes und wurde hier in folgende Strukturparameter eingeteilt: „air space“ - lufthaltiger Raum, „alveolar edema“ - alveoläres Ödem, „capillary lumen“ - Kapillarlumina und „septal tissue“ (zu „septal tissue“ s. 1.6.3, 4.3.2.2).

2.3.2 Volumendichte & massenspezifisches Volumen

Die Volumendichte $V_v(\text{Strukt}, \text{Ref})$ eines Strukturparameters (Strukt) in seinem Referenzraum (Ref) wurde errechnet, indem man die Gesamtzahl der auf einen Strukturparameter fallenden Testpunkte $\Sigma P(\text{Strukt})$ durch die Gesamtzahl aller auf dem

jeweiligen Level (s. Abb. 1) gezählten Testpunkte $\Sigma P(\text{Ref})$ dividierte („point counting“, s. auch 2.3.4, Abb. 2, 3):

$$V_V(\text{Strukt}, \text{Ref}) = \frac{\sum P_{(\text{Strukt})}}{\sum P_{(\text{Ref})}}$$

Level I:

$$V_V(\text{PAR}, \text{LUNG}) = \frac{\sum P_{(\text{PAR})}}{\sum P_{(\text{LUNG})}}$$

$$\sum P_{(\text{LUNG})} = \sum P_{(\text{PAR})} + \sum P_{(\text{N} - \text{PAR})} \quad [\text{testpoints}]$$

Level II:

$$V_V(\text{alv. edema}, \text{PAR}) = \frac{\sum P_{(\text{alv. edema})}}{\sum P_{(\text{PAR})}}$$

$$\sum P_{(\text{PAR})} = \sum P_{(\text{alv. edema})} + \sum P_{(\text{air space})} + \sum P_{(\text{sept. tissue})} + \sum P_{(\text{cap. lumen})} \quad [\text{testpoints}]$$

Anhand der Volumendichten $V_V(\text{Strukt}, \text{Ref})$, der absoluten Lungenvolumina V_{LUNG} (s. 2.2.4.2) und der Körpergewichte der Spendertiere W_R wurden die massenspezifischen Volumina der untersuchten Strukturparameter $MSV(\text{Strukt})$ berechnet:

$$MSV(\text{alv. edema}) = \frac{V_V(\text{alv. edema}, \text{PAR}) \times V_V(\text{PAR}, \text{LUNG}) \times V_{\text{LUNG}}}{W_R} \quad [\text{mm}^3/\text{g KG}]$$

Die Einbeziehung der absoluten Volumina V_{LUNG} (s. auch 1.6.2.4) in die Berechnung der massenspezifischen Volumina MSV gewährleistete eine korrekte Interpretation der stereologisch ermittelten Volumendichten V_V (Braendgaard & Gundersen 1986, Howard & Reed 1998, Ochs 2006a, Hsia et al. 2009).

2.3.3 Stereologisch-lichtmikroskopische online-Analyse

Die stereologisch-lichtmikroskopische Analyse fand auf der letzten Ebene (=Ebene der Sichtfelder, s. Abb. 1) der hierarchisch aufgebauten Stichprobennahme statt (s. 1.6.2.1). Das lichtmikroskopische Bild, das auf den Monitor übertragen und online untersucht

wurde, stellte eines der vielen Sichtfelder (s. Abb. 2, 3) dar. Die Gesamtheit dieser Sichtfelder in mäanderförmiger Abfolge ergab eine Art „virtuelles Raster“. Um die Position des ersten Sichtfeldes gemäß dem SURS-Prinzip (s. 1.6.2.1) zu bestimmen, wurde dieses „virtuelle Raster“ über den Lungenschnitt „geworfen“ („to cast a grid“, Howard & Reed 1998). Dazu startete man die Analyse außerhalb des um den Lungenschnitt von Hand gezeichneten Rahmens und bestimmte somit die Position des 1. Sichtfeldes zufällig. Gemäß dem SURS-Prinzip wurde mit der Analyse stets im gleichen Quadranten (hier in der rechten oberen Ecke des Objektträgers) begonnen. Da die Position des 1. Sichtfeldes zufällig bestimmt wurde, kamen die darauf folgenden Sichtfeldpositionen durch den konstanten, bereits vor der Analyse festgelegten Abstand zwischen 2 aufeinander folgenden Sichtfeldern ebenfalls zufällig zustande. Auf diese Weise hatte jede Region des untersuchten Lungenschnittes die gleiche Chance, von einem Sichtfeld getroffen und in die stereologisch-lichtmikroskopische Gesamtanalyse aufgenommen zu werden (Fehrenbach & Ochs 1998). Jedes Sichtfeld wurde sogleich online mit Hilfe des Punktzählverfahrens („point counting“, s. Abb. 2, 3) ausgewertet und ging somit in die stereologisch-lichtmikroskopische Gesamtanalyse ein.

2.3.4 „Point counting“: Rasterkreuze oder Testpunkte ?

Sollte mit Hilfe der Stereologie das 3-dimensionale Merkmal „Volumen“ (L^3)* analysiert werden, ist als geometrisches Testsystem ein Punkteraster (L^0) zu wählen. Die Multiplikation des geometrischen Testsystems mit dem zu untersuchenden Merkmal muss ein mindestens 3-dimensionales Ergebnis liefern - z.B. $L^3 \times L^0 = L^{(3+0)}$ (Ochs 2006a, Howard & Reed 1998, pp. 11–13, 58). Sollte z.B. das 2-dimensionale Merkmal „Fläche“ (L^2) untersucht werden, würde man als geometrisches Testsystem eine Linie (L^1) wählen - $L^2 \times L^1 = L^{(2+1)}$ (Ochs 2006a, Howard & Reed 1998, pp. 12-13). Da ein Rasterkreuz nicht 0-dimensional ist, stellt es bei der stereologischen Analyse des 3-dimensionalen Merkmals „Volumen“ lediglich eine Hilfestellung dar (Howard & Reed 1998, p. 32). Es muss ein imaginärer, dem Rasterkreuz anliegender Testpunkt festgelegt werden. Gemäß dem SURS-Prinzip (s. 1.6.2.1) blieb die Lokalisation dieses Testpunktes während der gesamten stereologisch-lichtmikroskopischen online-Analyse konstant.

* L (von “length“ (engl.) bzw. „Linie“ stammend) steht für den 1-dimensionalen Raum ($L=L^1$). Es werden mit L^0 der 0-dimensionale (=Punkt), mit L^2 der 2-dimensionale (=Fläche) und mit L^3 der 3-dimensionale (=Volumen) Raum gekennzeichnet (Howard & Reed 1998, p. 16).

2.3.5 Level-I-Analyse

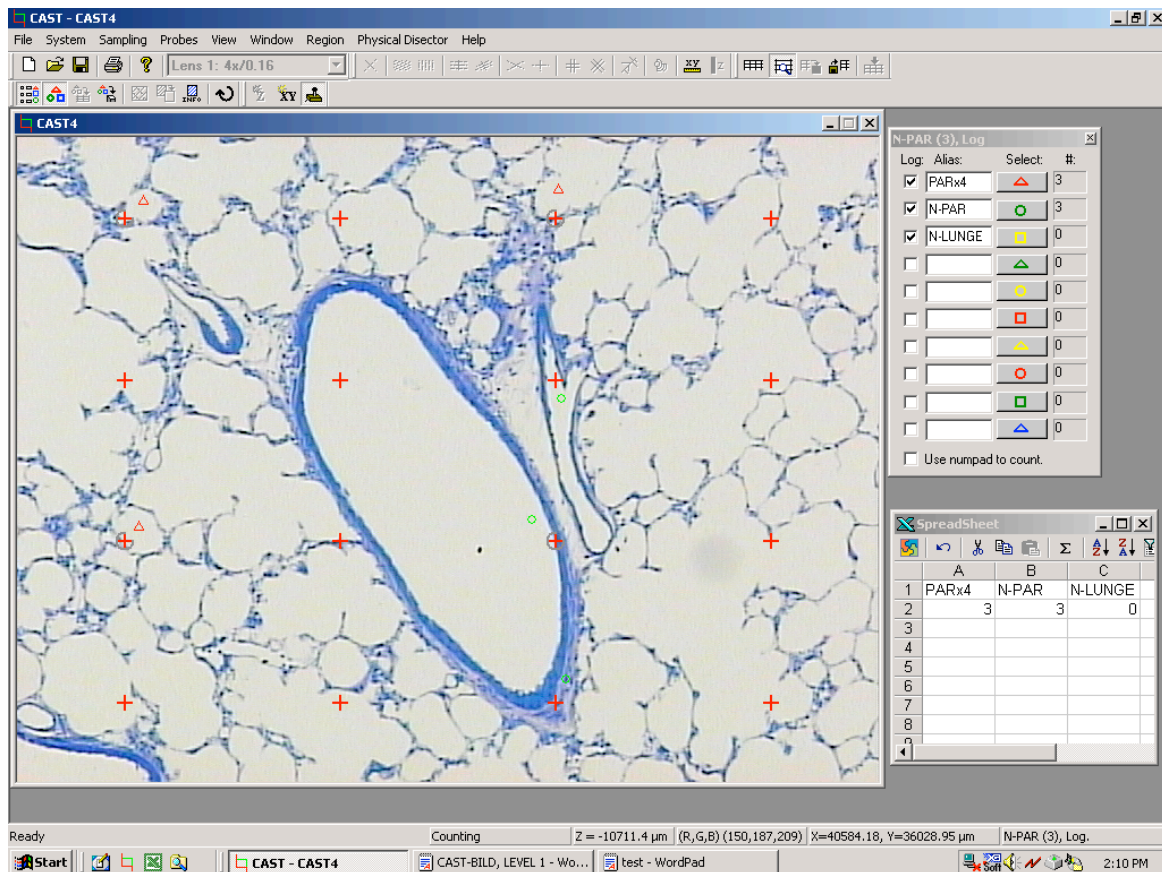


Abb. 2 „Point counting“: Level I

Die Abbildung zeigt ein Sichtfeld während der stereologisch-lichtmikroskopischen online-Analyse auf dem Level I (s. Abb. 1) mit Hilfe des Programms CAST Grid (Visiopharm, Hersholm, Dänemark). Die Level-I-Analyse erfolgte bei 4x Objektivvergrößerung (170x Endvergrößerung) mittels eines Rasters, das aus 4x4 Kreuzen (+) bestand. Der zu analysierende imaginäre Punkt (=Testpunkt, s. 2.3.4) befand sich gemäß dem SURS-Prinzip (s. 1.6.2.1) stets in der gleichen Position (hier in der rechten oberen Ecke des Rasterkreuzes). Die auf die Strukturparameter („PARENCHYMA“, „NON-PARENCHYMA“, „NON-LUNGE“) fallenden Testpunkte wurden entsprechend angeklickt und auf diese Weise für jeden Strukturparameter separat gezählt. Die nicht zur Lunge gehörenden Strukturen (z.B. Fettgewebe, Perikard, Blutgerinnsel etc.), die man bei der Präparation der Lungen mit bloßem Auge nicht erkannte, wurden im Rahmen der stereologisch-lichtmikroskopischen Level-I-Analyse als „NON-LUNGE“ quantifiziert und von der Gesamtanalyse rechnerisch ausgeschlossen. Der in der Level-I-Analyse am häufigsten vorkommende Strukturparameter „PARENCHYMA“ wurde mittels eines kleineren Rasters aus 2x2 Kreuzen (=grau umkreiste Rasterkreuze) ausgewertet („multi-purpose point-grid“, Howard & Reed 1998, pp. 58, 62). Die Anzahl der „PARENCHYMA“-Testpunkte wurde am Ende der Analyse durch Multiplikation mit dem Faktor 4 korrigiert, da das kleinere Raster aus 2x2 Kreuzen ein Viertel des Grundrasters (4x4 Kreuzen) ausmachte.

2.3.6 Level-II-Analyse

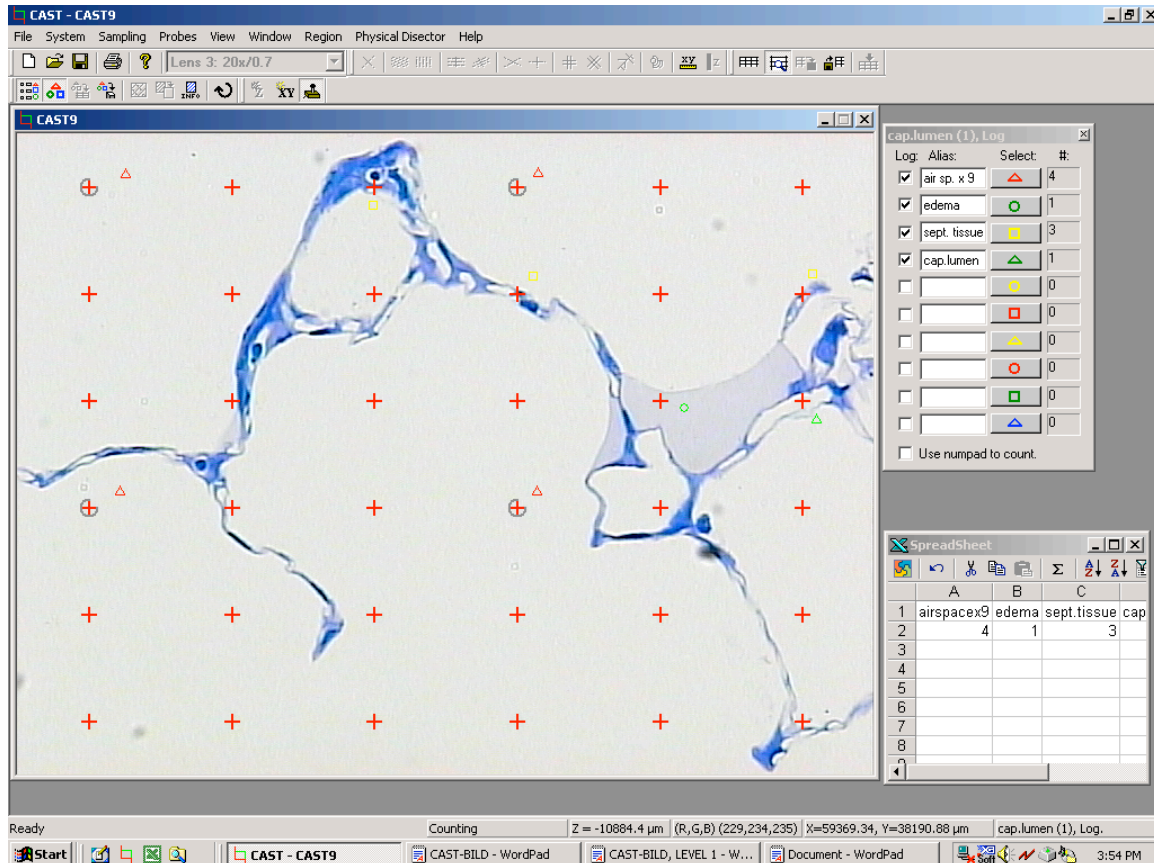


Abb. 3 „Point counting“: Level II

Die Abbildung zeigt ein Sichtfeld während der stereologisch-lichtmikroskopischen online-Analyse auf dem Level II (s. Abb. 1) mit Hilfe des Programms CAST Grid (Visiopharm, Hersholm, Dänemark). Die Level-II-Analyse erfolgte bei 20x Objektivvergrößerung (850x Endvergrößerung) mittels eines Rasters, das aus 6x6 Kreuzen (+) bestand. Der zu analysierende imaginäre Punkt (=Testpunkt, s. 2.3.4) befand sich gemäß dem SURS-Prinzip (s. 1.6.2.1) stets in der gleichen Position (hier in der rechten oberen Ecke des Rasterkreuzes). Die auf die Strukturparameter („alveolar edema“, „air space“, „septal tissue“ & „capillary lumen“; s. Legende zur Abb. 1, s. auch 1.6.3, 4.3.2.2) fallenden Testpunkte wurden entsprechend angeklickt und auf diese Weise für jeden Strukturparameter separat gezählt. Der in der Level-II-Analyse am häufigsten vorkommende Strukturparameter „air space“ wurde mittels eines kleineren Rasters aus 2x2 Kreuzen (=grau umkreiste Rasterkreuze) ausgewertet („multi-purpose point-grid“, Howard & Reed 1998, pp. 58, 62). Die Anzahl der auf den Strukturparameter „air space“ fallenden Testpunkte wurde am Ende der Analyse durch Multiplikation mit dem Faktor 9 korrigiert, da das kleinere Raster aus 2x2 Kreuzen ein Neuntel des Grundrasters (6x6 Kreuze) ausmachte.

2.4 Datenverarbeitung und Statistik

2.4.1 Immunhistologische Präparate

Die quantitative Analyse der immunhistochemisch positiven Zellen erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX51TF, Olympus Optical Co. LTD., Japan) bei 20x Objektivvergrößerung in 6 Sichtfeldern (je 0,15 mm²) pro Lungenschnitt. Die Auswahl der auszuwertenden Sichtfelder folgte dem Zufallsprinzip. Das lichtmikroskopische Bild wurde über eine Videokamera auf einen Monitor übertragen. Die Bildaufnahmen von den Immunhistologien (s. Abb. 7-9) sowie die Quantifizierung der immunhistochemisch positiven Zellen erfolgten mit Hilfe des Programms AnalySIS® (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland). Die explorative statistische Analyse der gewonnenen Zellzahlen wurde mit Hilfe des Programms (SPSS, München) durchgeführt. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests wurden einerseits die Kontrollgruppe (PBS tx) und die Versuchsgruppe (KGF tx) und andererseits die beiden internen Kontrollgruppen (PBS nat & KGF nat) untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) geprüft. Die grafische Darstellung (SPSS, München) erfolgt in Form von box plots, die den Median und die Perzentilen 0, 25, 75, 100 beinhalten (s. Abb. 10).

2.4.2 Stereologische Daten

Die explorative statistische Analyse der stereologisch-lichtmikroskopisch gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des Programms SigmaStat (Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests wurden einerseits die Kontrollgruppe (PBS tx) und die Versuchsgruppe (KGF tx) und andererseits die beiden internen Kontrollgruppen (PBS nat & KGF nat) untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) geprüft. Die Daten werden im Kapitel Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (s. Tab. 8-11). Die grafische Darstellung (SigmaPlot, Jandel Scientific) erfolgt in Form von box plots, die den Median und die Perzentilen 0, 25, 75, 100 beinhalten (s. Abb. 5, 6).

3 Ergebnisse

3.1 Lungenpräparate für die Stereologie

Das Parenchym der mit PBS behandelten Lungentransplantate (**PBS tx**) wies keine schweren Beeinträchtigungen auf. In den Alveolen der PBS tx fand sich deutliches Ödem (s. Abb. 4).

Die mit KGF behandelten Lungentransplantate (**KGF tx**) zeigten intaktes Parenchym mit einer Hyperplasie der AE II und einer geringen Ausprägung des alveolären Ödems (s. Abb. 4).

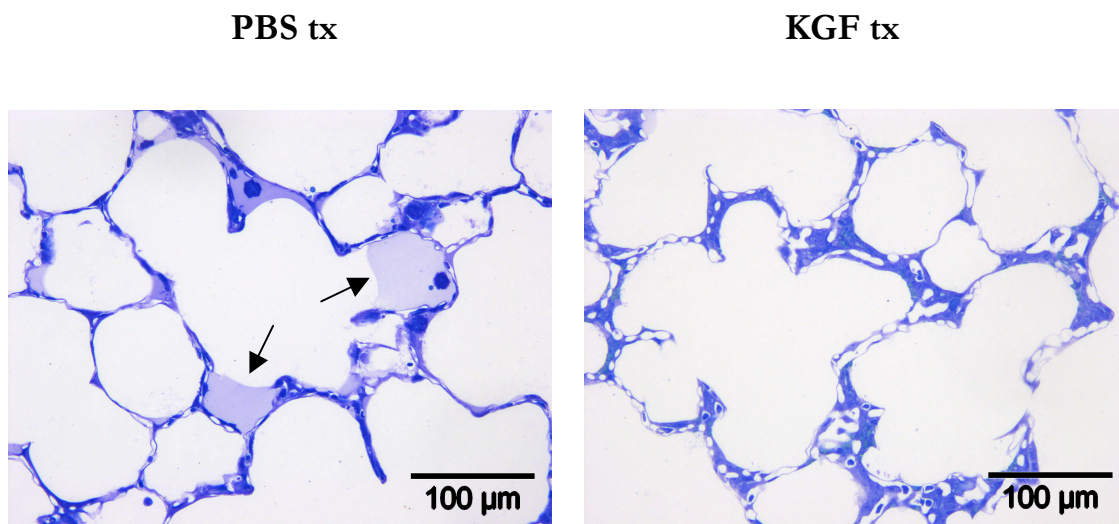


Abb. 4 Histomorphologie der Lungentransplantate

Dargestellt sind 2 µm dünne, mit Methylenblau/Azur II gefärbte Kunststoffpräparate der Lungentransplantate am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Transplantation. Die Lungen wurden vor der Transplantation mit PBS (n=7) bzw. KGF (n=6) behandelt. Das Parenchym des mit PBS behandelten Lungentransplantates (PBS tx) zeigt deutliches Alveolarödem (→). Abgesehen davon finden sich in dem PBS-behandelten Lungentransplantat keine schweren Parenchymschäden. Das Parenchym des mit KGF behandelten Lungentransplantates (KGF tx) ist intakt und weist eine deutliche Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II auf. Die Ausprägung des Alveolarödems im KGF-behandelten Lungentransplantat ist gering. Die Fixierung der Lungen dieser Versuchsreihe (=Versuchsreihe für die stereologische Quantifizierung des Alveolarödems) erfolgte intravasal (s. 2.2.4.1), sodass die Morphologie des alveolären Raumes einschließlich des Alveolarödems, der alveolären Makrophagen und des Surfactants weitgehend unbeeinträchtigt blieb.

3.1.1 Volumendichten

Zwischen den ermittelten Volumendichten des alveolären Ödems $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ der PBS tx und KGF tx fand sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,005$; s. Abb. 5, Tab. 8). $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ in den PBS tx betrug $3,4 \pm 1,1\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) versus $1,6 \pm 0,8\%$ in den KGF tx. Die Volumendichten weiterer Strukturparameter („air space“, „septal tissue“ & „capillary lumen“) ergaben zwischen PBS tx und KGF tx keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 8). Zwischen den korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (**PBS nat** & **KGF nat**) fanden sich hinsichtlich der Volumendichten aller 4 Strukturparameter in ihrem Referenzraum „PARENCHYMA“ ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 9).

Tab. 8 Volumendichten: Lungentransplantate

Parameter	PBS tx	KGF tx
Volumendichte [%]		
NON-PARENCHYMA	$11,2 \pm 2,1$	$11,0 \pm 3,8$
PARENCHYMA	$88,8 \pm 2,1$	$89,1 \pm 3,8$
air space	$83,6 \pm 3,8$	$84,8 \pm 2,2$
alveolar edema	$3,4 \pm 1,1$	$1,6 \pm 0,8 *$
septal tissue	$8,8 \pm 2,3$	$9,8 \pm 1,3$
capillary lumen	$4,2 \pm 2,1$	$3,8 \pm 1,4$

Dargestellt sind die Volumendichten (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Strukturparameter „NON-PARENCHYMA“, „PARENCHYMA“, „air space“, „alveolar edema“, „septal tissue“ und „capillary lumen“ der mit PBS (PBS tx, n=7) bzw. mit KGF (KGF tx, n=6) behandelten Lungentransplantate. * $p \leq 0,05$

Tab. 9 Volumendichten: Native Lungen

Parameter	PBS nat	KGF nat
Volumendichte [%]		
NON-PARENCHYMA	$12,5 \pm 2,4$	$10,2 \pm 2,2$
PARENCHYMA	$87,5 \pm 2,4$	$89,8 \pm 2,2$
air space	$88,0 \pm 2,8$	$87,4 \pm 2,8$
alveolar edema	$0,4 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,2$
septal tissue	$7,7 \pm 2,1$	$8,1 \pm 1,1$
capillary lumen	$3,9 \pm 0,8$	$4,2 \pm 2,0$

Dargestellt sind die Volumendichten (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Strukturparameter „NON-PARENCHYMA“, „PARENCHYMA“, „air space“, „alveolar edema“, „septal tissue“ und „capillary lumen“ der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Empfänger der PBS- bzw. KGF-behandelten Lungentransplantate (PBS nat, n=7 & KGF nat, n=6).

3.1.2 Massenspezifische Volumina

Obwohl die Zuteilung der Tiere zu den experimentellen Gruppen dem Zufallsprinzip folgte, fanden sich hinsichtlich der Körpergewichte [g] der Spendertiere zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede (s. Tab. 10, 11). Durch die Berechnung der massenspezifischen Volumina MSV (s. auch 2.3.2) wurde den gegebenenfalls allein auf unterschiedlichen Körpergewichten der Spendertiere basierenden Differenzen Rechnung getragen.

Die Berechnung von MSV erfolgte mit Hilfe (1) der stereologisch ermittelten Volumendichten V_v (s. Tab. 8, 9), (2) der nach Scherle (1970) gemessenen, absoluten Lungenvolumina V_{LUNG} (s. auch 2.2.4.2) und (3) der Körpergewichte der Spendertiere W_R (s. auch 2.3.2). Die Einbeziehung der absoluten Volumina V_{LUNG} in die Berechnung der massenspezifischen Volumina MSV (s. 2.3.2) gewährleistete dabei eine korrekte Interpretation der stereologisch ermittelten Volumendichten V_v (zu „reference trap“ s. 1.6.2.4; Braendgaard & Gundersen 1986, Howard & Reed 1998, Ochs 2006a).

Der Vergleich von MSV(alv. edema) der PBS tx & der KGF tx ergab einen signifikanten Unterschied ($p=0,035$). MSV(alv. edema) betrug in den PBS tx $0,32 \pm 0,11$ [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] versus $0,18 \pm 0,10$ [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] in den KGF tx (s. Abb. 6, Tab. 10). Zwischen den korrespondierenden PBS nat & KGF nat fanden sich hinsichtlich MSV(alv. edema) keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 11).

MSV von weiteren Strukturparametern („air space“, „septal tissue“ & „capillary lumen“) ergab sowohl zwischen den Lungentransplantaten (PBS tx & KGF tx) als auch zwischen den korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 10, 11).

Tab. 10 Massenspezifische Volumina: Lungentransplantate

Parameter	PBS tx	KGF tx
Körpergewicht [g]	239,0 ± 2,2	259,0 ± 14,0 * (s. 3.1.2)
Absolutes Lungenvolumen [mm ³]	2644,3 ± 708,4	3288,4 ± 312,6 *
Massenspezifisches Volumen [mm ³ /g KG]		
LUNG	11,1 ± 3,0	12,7 ± 1,1
NON-PARENCHYMA	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,5
PARENCHYMA	9,8 ± 2,5	11,3 ± 1,1
air space	8,2 ± 2,2	9,6 ± 1,0
alveolar edema	0,32 ± 0,11	0,18 ± 0,10 *
septal tissue	0,86 ± 0,35	1,12 ± 0,17
capillary lumen	0,38 ± 0,13	0,42 ± 0,15

Die Volumendichten (s. Tab. 8), die Körpergewichte der Spendertiere und die absoluten Lungenvolumina, die in der vorliegenden Tabelle dargestellt sind, wurden zur Berechnung der massenspezifischen Volumina (s. auch 2.3.2) des Basisreferenzraumes „LUNG“ und der Strukturparameter „NON-PARENCHYMA“, „PARENCHYMA“, „air space“, „alveolar edema“, „septal tissue“ und „capillary lumen“ der mit PBS (PBS tx, n=7) bzw. mit KGF (KGF tx, n=6) behandelten Lungentransplantate eingesetzt.

Datendarstellung: Mittelwert ± Standardabweichung. * p ≤ 0,05

Tab. 11 Massenspezifische Volumina: Native Lungen

Parameter	PBS nat	KGF nat
Körpergewicht [g]	241,1 ± 1,4	258,3 ± 5,5 * (s. 3.1.2)
Absolutes Lungenvolumen [mm ³]	4513,7 ± 1122,3	5756,7 ± 1091,4
Massenspezifisches Volumen [mm ³ /g KG]		
LUNG	18,7 ± 4,7	22,3 ± 4,2
NON-PARENCHYMA	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,6
PARENCHYMA	16,3 ± 4,5	20,1 ± 3,9
air space	14,6 ± 4,4	17,5 ± 3,6
alveolar edema	0,06 ± 0,06	0,08 ± 0,05
septal tissue	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,4
capillary lumen	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,4

Die Volumendichten (s. Tab. 9), die Körpergewichte der Spendertiere und die absoluten Lungenvolumina, die in der vorliegenden Tabelle dargestellt sind, wurden zur Berechnung der massenspezifischen Volumina (s. auch 2.3.2) des Basisreferenzraumes „LUNG“ bzw. der Strukturparameter „NON-PARENCHYMA“, „PARENCHYMA“, „air space“, „alveolar edema“, „septal tissue“ und „capillary lumen“ der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Empfänger der PBS- bzw. KGF-behandelten Lungentransplantate (PBS nat, n=7 & KGF nat, n=6) eingesetzt.

Datendarstellung: Mittelwert ± Standardabweichung. * p ≤ 0,05

3.2 Immunhistologie

Sowohl in den Lungentransplantaten (PBS tx & KGF tx) als auch in den korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat) lagen keine schweren Parenchymschäden vor.

Die KGF tx zeigten eine deutliche Hyperplasie der AE II (s. Abb. 7,8,9) und entsprachen damit der Histomorphologie der KGF tx der stereologischen Versuchsreihe (s. Abb. 4).

Der Vergleich der Summen der ED1-positiven Zellen (=Paraffinpräparate) einerseits zwischen PBS tx & KGF tx und andererseits zwischen den korrespondierenden PBS nat & KGF nat ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. Abb. 10). Vereinzelt ED2- und R73-positive Zellen (=Gefrierschnitte) fanden sich sowohl in den PBS tx & KGF tx als auch in den PBS nat & KGF nat (s. Abb. 8, 9). Die quantitative Analyse der immunpositiven Zellen war auf Grund der für die Gefrierpräparate (ED2, R73) üblichen unzureichenden Gewebequalität nicht möglich und erfolgte aus diesem Grund nur an den Paraffinpräparaten (ED1).

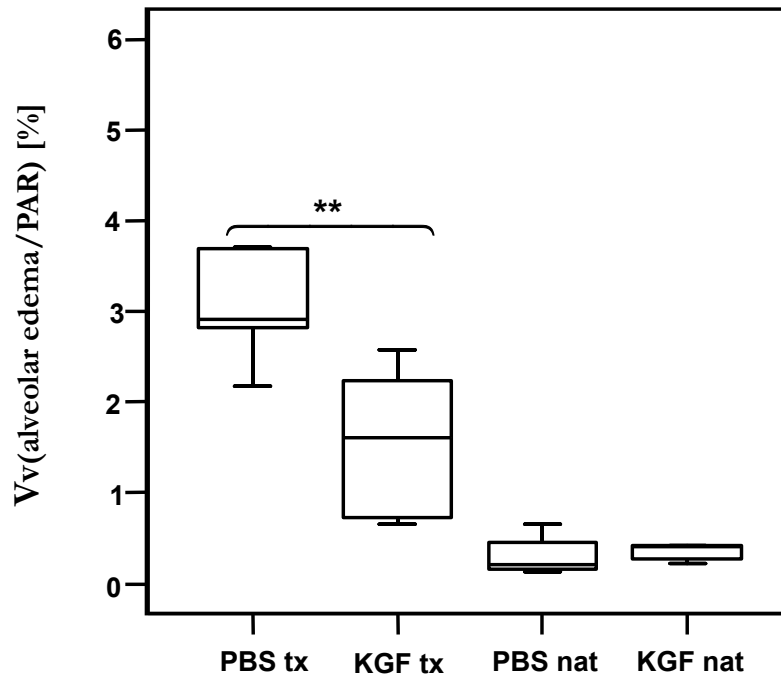


Abb. 5 Alveoläres Ödem: Volumendichten

Box plots, die den Median und die Perzentilen 0, 25, 75, 100 darstellen, zeigen die Volumendichten des alveolären Ödems $V_v(\text{alveolar edema, PAR})$ in seinem Referenzraum „PARENCHYMA“ am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Lungentransplantation. Abgebildet sind $V_v(\text{alveolar edema, PAR})$ der Lungentransplantate, die vor der Transplantation mit PBS (PBS tx, n=7) bzw. mit KGF (KGF tx, n=6) behandelt wurden sowie der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat). ** $p \leq 0,01$

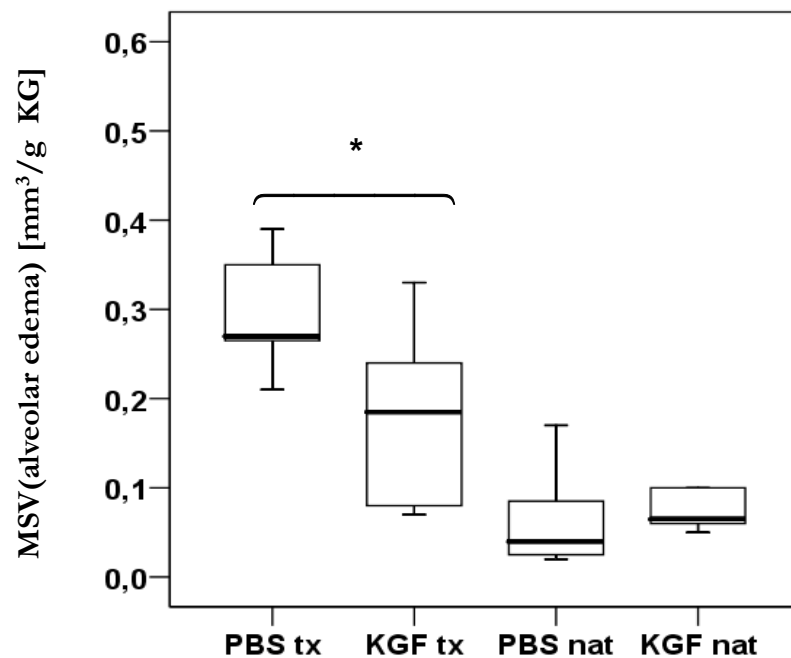


Abb. 6 Alveoläres Ödem: Massenspezifische Volumina

Box plots, die den Median und die Perzentilen 0, 25, 75, 100 darstellen, zeigen die massenspezifischen Volumina des alveolären Ödems MSV(alveolar edema) am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Lungentransplantation. Abgebildet sind MSV(alveolar edema) der Lungentransplantate, die vor der Transplantation mit PBS (PBS tx, n=7) bzw. mit KGF (KGF tx, n=6) behandelt wurden sowie der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat). * $p \leq 0,05$

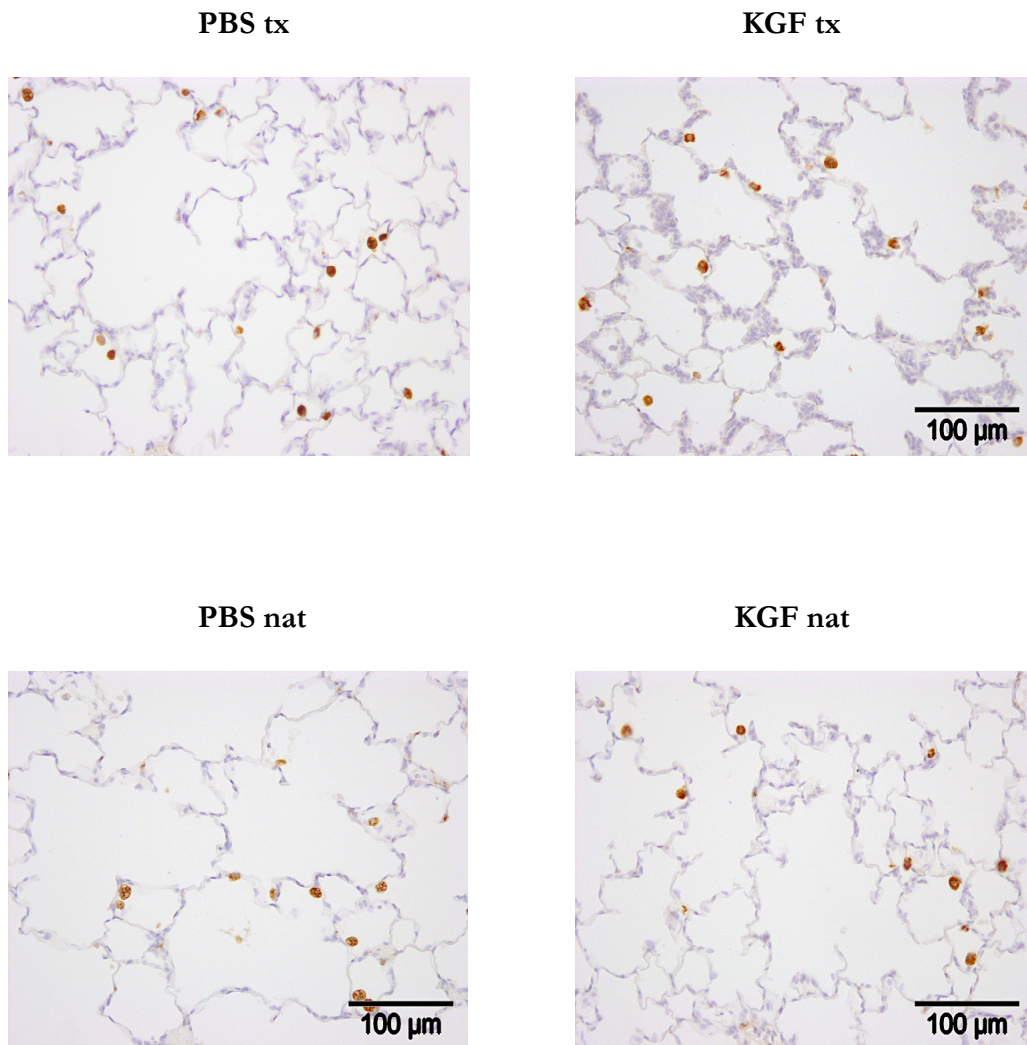


Abb. 7 Immunhistologie mit dem Antikörper ED1

Dargestellt sind 6 µm dünne, mit Hämalaun gegengefärbte Paraffinschnitte der mit PBS (PBS tx, n=5) bzw. mit KGF (KGF tx, n=7) behandelten Lungentransplantate sowie der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat) am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Lungentransplantation. Der monoklonale Antikörper ED1 bindet an das CD68-artige lysosomale Membranantigen und markiert in den Rattenlungen Alveolarmakrophagen. Sowohl in den PBS- als auch in den KGF-behandelten Lungentransplantaten und den korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger zeigen sich ED1-positive Zellen. Das mit KGF behandelte Lungentransplantat weist eine deutliche Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II auf. Die Fixierung der Lungen dieser Versuchsreihe erfolgte über die Trachea (s. auch 2.2.5.1).

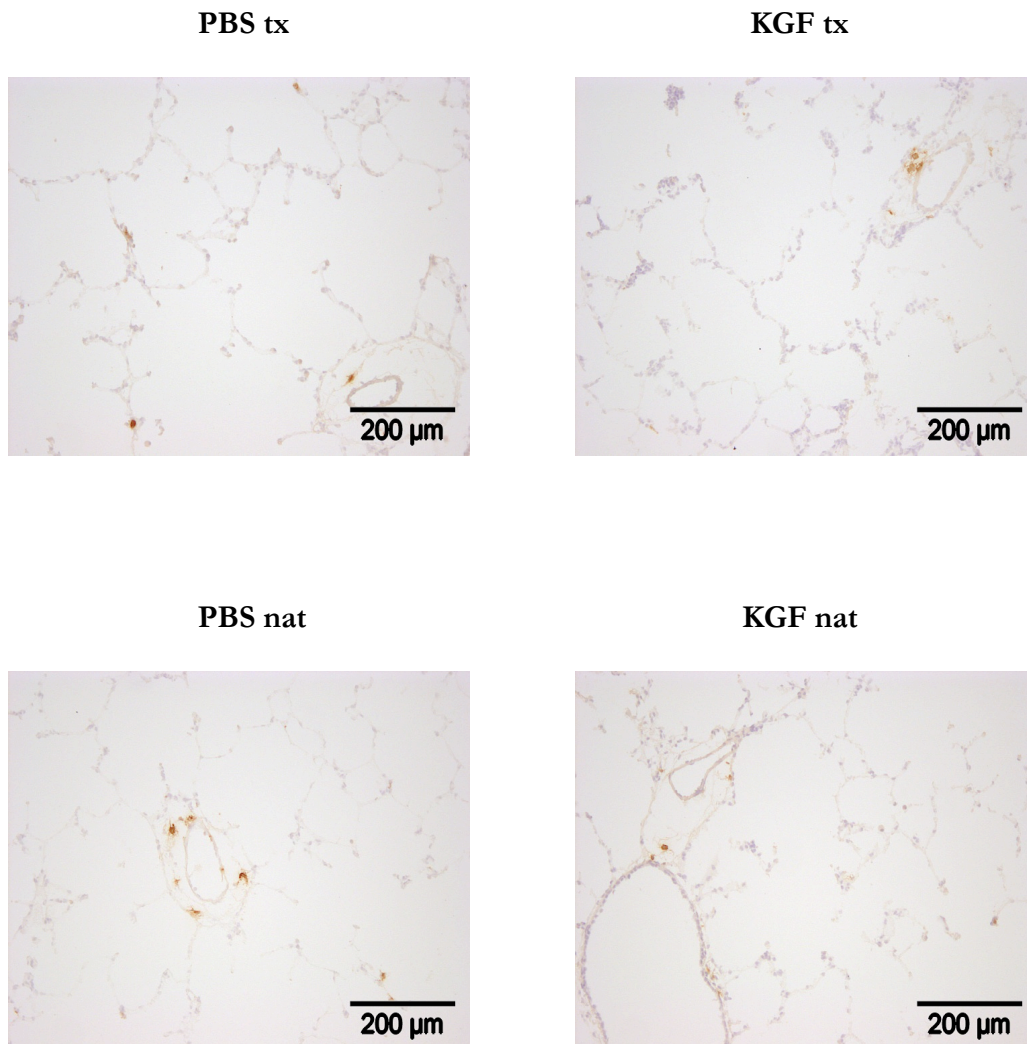


Abb. 8 Immunhistologie mit dem Antikörper ED2

Dargestellt sind 10 µm dünne, mit Hämalaun gegengefärbte Gefrierschnitte der mit PBS (PBS tx, n=9) bzw. mit KGF (KGF tx, n=10) behandelten Lungentransplantate sowie der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat) am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Lungentransplantation. Der monoklonale Antikörper ED2 bindet an den „hemoglobin scavenger“ Rezeptor CD163 und markiert in den Lungen der Ratte die im peribronchovaskulären Bindegewebe lokalisierten Makrophagen. Vereinzelt ED2-positive Zellen finden sich im peribronchovaskulären Bindegewebe der Lungen aller 4 Gruppen. Das mit KGF behandelte Lungentransplantat weist eine Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II auf. Die Lungen dieser Versuchsreihe wurden vor der Fixierung lavagiert (s. 2.2.5.2).

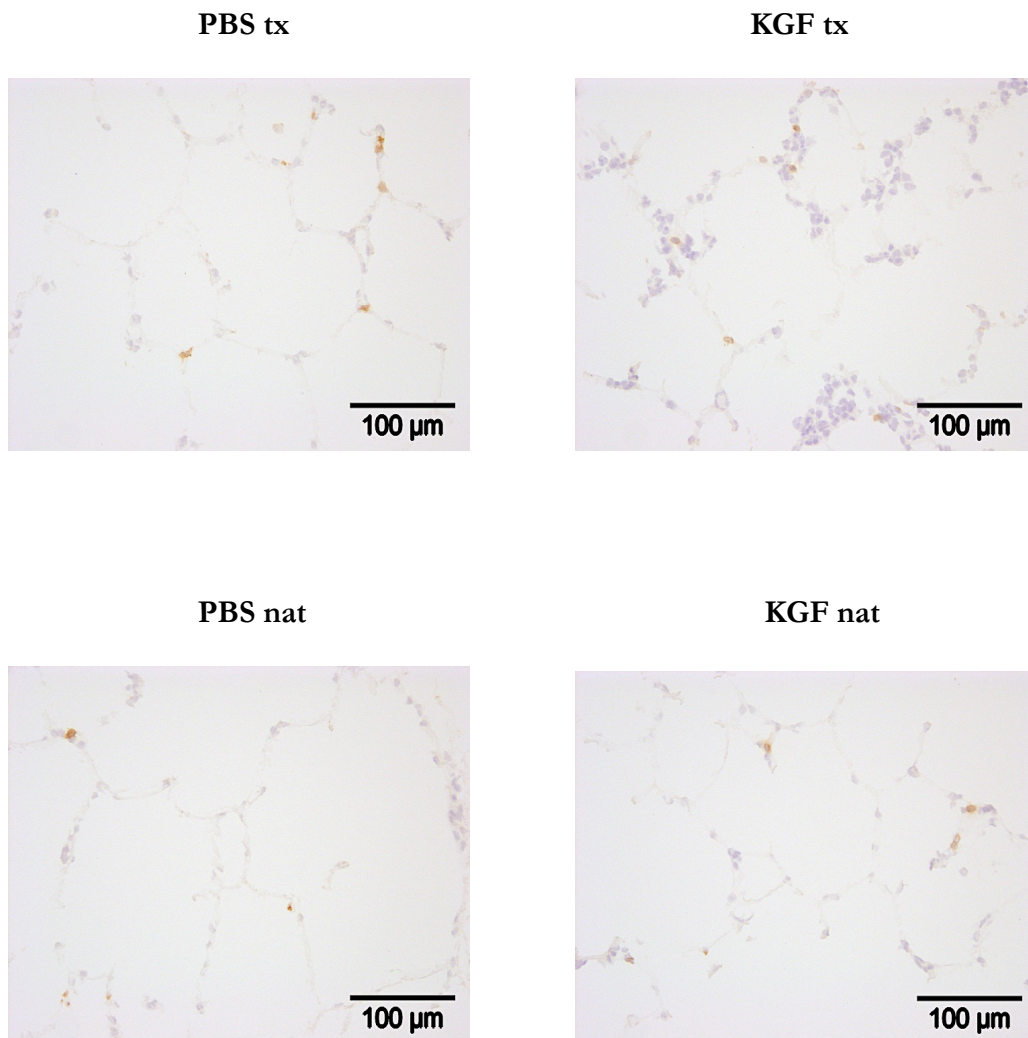


Abb. 9 Immunhistologie mit dem Antikörper R73

Dargestellt sind 10 µm dünne, mit Hämalun gegengefärbte Gefrierschnitte der mit PBS (PBS tx, n=9) bzw. mit KGF (KGF tx, n=10) behandelten Lungentransplantate sowie der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat) am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Lungentransplantation. Der monoklonale Antikörper R73 erkennt ein Epitop der konstanten Determinante der β -Kette des α -/ β -T-Zell-Rezeptors. Sowohl in den PBS- als auch in den KGF-behandelten Lungentransplantaten und den korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger zeigen sich vereinzelte R73-positive Zellen. Das mit KGF behandelte Lungentransplantat weist eine deutliche Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II auf. Die Lungen dieser Versuchsreihe wurden vor der Fixierung lavagiert (s. 2.2.5.2).

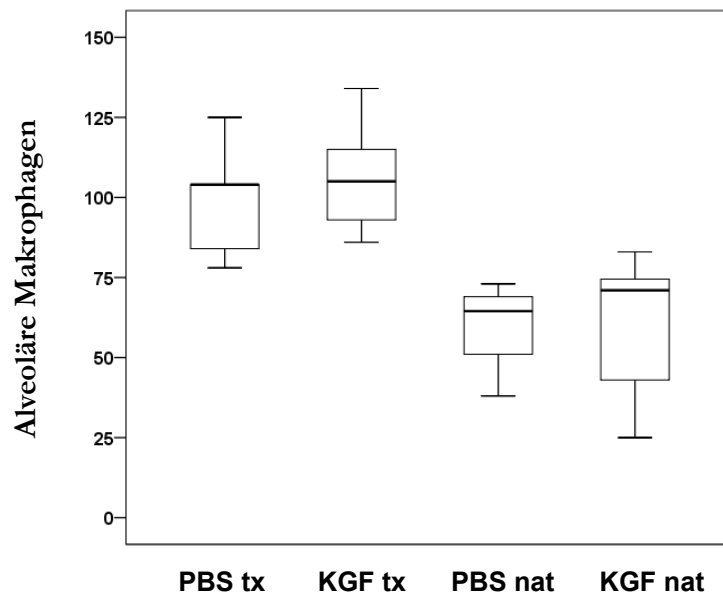


Abb. 10 Alveoläre Makrophagen: Zellzahlen

Box plots, die den Median und die Perzentilen 0, 25, 75, 100 darstellen, zeigen die Anzahl der ED1-positiven Zellen im Lungenparenchym am Tag 1 nach der isogenen orthotopen linksseitigen Lungentransplantation. Abgebildet sind die Summen der ED1-positiven Zellen der Lungentransplantate, die vor der Transplantation mit PBS (PBS tx, n=5) bzw. mit KGF (KGF tx, n=7) behandelt wurden sowie der korrespondierenden rechten nativen Lungen der Transplantatempfänger (PBS nat & KGF nat). Hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

4.1 Das experimentelle Modell des I&R-Schadens

Der transplantationsassoziierte I&R-Schaden, der während einer LTx unvermeidbar ist, stellt einen bekannten Auslöser der Lungeninsuffizienz in den ersten postoperativen 72 h dar (de Perrot et al. 2003, van Raemdonck et al. 2004, Christie et al. 2005b). Die als PGD bezeichnete frühe Insuffizienz des Lungentransplantates entspricht aus dem klinischen Blickwinkel der intensivmedizinischen Entität ALI bzw. ARDS und ist in erster Linie durch das geschädigte Surfactantsystem, das alveoläre Ödem und die daraus resultierenden funktionellen Einschränkungen charakterisiert (de Perrot et al. 2003, Tazelaar & Starnes 1994, Christie et al. 2005a, Ochs 2006b). Zahlreiche tierexperimentelle Arbeiten an Modellen der Lungenschädigung im Sinne von ALI bzw. ARDS belegten bereits mehrfach das pulmonal-protective Potential des exogenen KGF (Ware & Matthay 2002).

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, den KGF-Effekt auf das I&R-assoziierte alveoläre Ödem mit Hilfe der „design-based“ Stereologie zu analysieren. Zusätzlich sollte die KGF-Wirkung auf die I&R-assoziierte Infiltration der Lungen durch MF und T-Lymphozyten untersucht werden.

Der transplantationsassoziierte I&R-Schaden ist im Vergleich zu den Ursachen der akuten bzw. chronischen Abstoßung in seiner Natur immunologisch unspezifisch (de Perrot et al. 2003).

Für die isogene LTx wurden in dieser Arbeit männliche LEW(RT1^d)-Inzuchtratten eingesetzt. Die Tiere wurden bereits am Tag 1 nach LTx eingeschläfert, um die linken transplantierten (PBS tx & KGF tx) und die korrespondierenden rechten nativen Lungen (PBS nat & KGF nat) für die geplanten Untersuchungen zu explantieren. Der Entnahmezeitpunkt - Tag 1 nach LTx - ergab sich aus den Überlegungen während der Planung des experimentellen Designs und hing mit dem Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit zusammen – der Erfassung des I&R-assoziierten alveolären Ödems. Die vorausgegangenen Untersuchungen von Schmidt et al. (2007) zeigten, dass das Lungenödem bei der Ratte am Tag 1 nach LTx am stärksten ausgeprägt war.

Die speziell für die stereologische Analyse der Lungen konzipierte Gewebeaufbereitung (s. 2.2.4.1, Tab. 3) erlaubte eine adäquate Fixierung des alveolären Ödems (Fehrenbach & Ochs 1998, Fehrenbach et al. 2001a, Bachofen et al. 1982, Hsia et al. 2009, p. 400).

4.2 Stereologie versus gravimetrische Analyse

Warum entschied man sich für die Stereologie und nicht für die gravimetrische Analyse, als Methode der Quantifizierung des alveolären Ödems?

(1) Im Hinblick auf die Quantifizierung des Lungenödems stellt die Stereologie im Vergleich zur gravimetrischen Analyse („wet to dry weight ratios“) eine sensitivere Methode dar (Fehrenbach et al. 2001a). Da die Ischämiezeiten in der vorliegenden Arbeit an das Konzept der LDLLT angepasst und dementsprechend möglichst kurz gehalten wurden (s. auch 2.2.3), war unter anderem auch eine nur geringgradige Ausprägung des alveolären Ödems zu erwarten. Um das Alveolarödem dennoch effektiv erfassen zu können, musste die Quantifizierungsmethode eine hohe Sensitivität aufweisen.

(2) Die Stereologie gewährleistet im Falle der Evaluierung des Lungenödems im Vergleich zur gravimetrischen Analyse eine hohe Spezifität, da sie eine kompartmentbezogene (=intraalveolär, interstitiell & peribronchovaskulär) Quantifizierung des Lungenödems und außerdem die quantitative Erfassung der intravasalen Lumina ermöglicht (Ochs et al. 2006b, Fehrenbach et al. 2001a, Fehrenbach et al. 1999b).

(3) Die stereologisch ermittelten Daten erlauben im Gegensatz zu den gravimetrisch ermittelten „wet to dry weight ratios“ eine Interpretation des Ausmaßes des alveolären Ödems im Bezug auf die pulmonale Oxygenierungsfunktion. Eine Arbeit von Fehrenbach et al. (2001a) über die Evaluierung des Lungenödems am Modell des I&R-Schadens in isolierten Rattenlungen und die Beziehung der stereologisch und gravimetrisch ermittelten Daten im Bezug auf das pulmonale Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} * zeigte eine signifikante Korrelation ($r=-0,530$; $p=0,001$) zwischen ΔP_{O_2} und der stereologisch ermittelten $V_v(\text{alv. edema, PAR})$. Zwischen ΔP_{O_2} und „wet to dry weight ratios“ konnte dagegen keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Fehrenbach et al. 2001a).

4.3 KGF schützt vor dem I&R-assozierten Alveolarödem

4.3.1 Histomorphologie der Präparate für die Stereologie

Histomorphologisch wies das Parenchym der PBS tx keine schweren Beeinträchtigungen auf. In den Alveolen der PBS tx fand sich deutliches Ödem (s. Abb. 4).

Die KGF tx zeigten intaktes Parenchym mit einer Hyperplasie der AE II und einer geringen Ausprägung des alveolären Ödems (s. Abb. 4).

* $\Delta P_{O_2} = P_{aO_2} - P_{vO_2}$, P_{aO_2} - O_2 -Partialdruck im Effluat des linken Atriums, P_{vO_2} - O_2 -Partialdruck im desoxygenierten Perfusat (Fehrenbach et al. 2001a).

4.3.2 Stereologische Daten

Die stereologisch ermittelten Volumendichten V_v sind nur dann garantiert „unbiased“, wenn die Stichproben für das ganze Organ repräsentativ sind. Das bedeutet, dass jede Region der Lunge die gleiche Chance haben muss, in die Gesamtanalyse einzugehen („uniform randomness“, Howard & Reed 1998, Hsia et al. 2009; s. auch 1.6.1, 1.6.2.1).

Die „design-based“ (=„unbiased“) Stereologie liefert durch die quantitative Analyse von wenigen repräsentativen, 2-dimensionalen Stichproben* mathematisch und statistisch genaue bzw. valide Aussagen über die Anzahl, die Länge, die Fläche und das Volumen der 3-dimensionalen Objekte, ohne dass die Form, die Größe und die Verteilung der zu untersuchenden Objekte eine Rolle spielt („assumption- & model-free approach“; Matheron 1972, Miles & Davy 1976, Fehrenbach & Ochs 1998, Baddeley & Vedel Jensen 2005, Hsia et al. 2009). Die Methoden der „design-based“ Stereologie sind durch eine hohe statistische** und praktische Effizienz gekennzeichnet, sodass durch eine optimale Zahl der Stichproben innerhalb eines adäquaten Zeitraums zuverlässige Daten gewonnen werden können („do more less well!“ Gundersen & Osterby 1981; „multi-purpose test system“ Hsia et al. 2009; Howard & Reed 1998, p. 62; Fehrenbach et al. 2001a, Weibel 1981, Ochs 2006a, Baddeley & Vedel Jensen 2005).

4.3.2.1 Volumendichten des alveolären Ödems

Die stereologisch ermittelten Volumendichten des alveolären Ödems zeigten, dass die intratracheale KGF-Behandlung der Lungen vor der isogenen LTx sie vor dem I&R-assozierten Alveolarödem statistisch signifikant ($p=0,005$) schützte (s. Tab. 8, Abb. 5). $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ in den PBS tx betrug 3,4% versus 1,6% in den KGF tx.

Somit reduzierte die KGF-Behandlung die Volumendichte des I&R-assozierten Alveolarödems in seinem Referenzraum „PARENCHYMA“ rund um die Hälfte. Für den Leser können auf den ersten Blick die Werte 3,4% bzw. 1,6% jedoch nicht biologisch bedeutsam erscheinen. Das Kapitel 4.3.2.2 gibt eine Erklärung, weshalb dem nicht so ist.

* Der Begriff „Stichproben“ hier im Kontext der Gewinnung von 3-dimensionalen Informationen hebt den grundlegenden Unterschied zwischen der Stereologie und den modernen schnittbildgebenden Verfahren (z.B. Computertomographie) hervor. In der statistisch geprägten „design-based“ Stereologie wird anhand von wenigen repräsentativen 2-dimensionalen Stichproben von dem 2-dimensionalen zum 3-dimensionalen Raum extrapoliert. In der Bildgebung (z.B. durch eine Computertomographie) geht es hingegen um eine Vielzahl an Schnittbildern, aus denen die komplette 3-dimensionale Geometrie des untersuchten Organs rekonstruiert werden kann (Hsia et al. 2009).

** Statistische Effizienz \rightarrow Syn.: Präzision, Zuverlässigkeit, Wiederholbarkeit, Reliabilität (Röhrig et al. 2009)

4.3.2.2 Fraktion „alveolar edema“/„septal tissue“

An dieser Stelle sollte noch einmal (s. auch 1.6.3) betont werden, dass das stereologisch definierte „PARENCHYMA“ sich von dem anatomisch definierten Parenchym grundsätzlich unterscheidet. In der Anatomie bzw. Histologie versteht man unter dem Begriff Parenchym das der spezifischen Funktion des Organs dienende Organgewebe. Das stereologisch definierte „PARENCHYMA“ der Lungen schließt im Gegensatz zum anatomisch definierten Parenchym ausschließlich die für den unmittelbaren Gasaustausch zuständigen Lungenabschnitte als Ganzes ein. Demzufolge beinhaltet das stereologisch definierte „PARENCHYMA“ der Lungen nicht nur „septal tissue“ und „capillary lumen“, sondern auch „air space“ und „alveolar edema“.

In den PBS tx betrug die Volumendichte des Strukturparameters „alveolar edema“ 1,6% des Referenzraumes „PARENCHYMA“ (=100%). Den restlichen Anteil des Referenzraumes „PARENCHYMA“ machten $V_v(\text{air space, PAR})=84,8\%$, $V_v(\text{septal tissue, PAR})=9,8\%$ und $V_v(\text{capillary lumen, PAR})=3,8\%$ aus (s. Tab. 8).

In den KGF tx betrug die Volumendichte des Strukturparameters „alveolar edema“ 3,4% des Referenzraumes „PARENCHYMA“ (=100%). Den restlichen Anteil des Referenzraumes „PARENCHYMA“ machten $V_v(\text{air space, PAR})=83,6\%$, $V_v(\text{septal tissue, PAR})=8,8\%$ und $V_v(\text{capillary lumen, PAR})=4,2\%$ aus (s. Tab. 8).

Möchte man hier die Ergebnisse der $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ diskutieren, darf man es nicht außer Acht lassen, dass alleine der Strukturparameter „air space“, der der Alveolarluft entsprach, bereits 83,6% (PBS tx) bzw. 84,8% (KGF tx) des Referenzraums „PARENCHYMA“ (=100%) einnahm. Einerseits ist der Strukturparameter „air space“ ein Teil des stereologisch definierten Referenzraumes „PARENCHYMA“ und darf von den Berechnungen keinesfalls ausgeschlossen werden (s. auch 1.6.3, 2.3.1). Andererseits spielt der Strukturparameter „air space“ (=Alveolarluft) im Bezug auf die Behinderung des Gasaustausches keine Rolle. Da der Gasaustausch hier durch das die Gasaustauschfläche auskleidende Alveolarödem behindert wird, war es sinnvoll, die 2 Strukturparameter „alveolar edema“ und „septal tissue“ im gegenseitigen Verhältnis zu betrachten und die Fraktion „alveolar edema“/„septal tissue“ auszurechnen. Der Strukturparameter „septal tissue“ im stereologisch definierten „PARENCHYMA“ (d.h. ausschließlich in den Lungenabschnitten, die für den unmittelbaren Gasaustausch zuständig sind!) stellt nicht nur das wenige Stütz- und Bindegewebe, sondern auch die AE I, AE II, die Kapillarwände und das Gewebe dazwischen, das unter anderem auch die Basalmembranen beinhaltet, dar

(s. auch 1.6.3). Mit Hilfe der $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ und $V_v(\text{septal tissue, PAR})$ (s. Tab. 8) konnte die Fraktion des Strukturparameters „alveolar edema“ am Strukturparameter „septal tissue“ berechnet werden und betrug in den PBS tx $41,1 \pm 17,8\%$ versus nur $16,6 \pm 9,8\%$ in den KGF tx. Dieser Befund bedeutete im Bezug auf das I&R-assoziierte alveoläre Ödem eine biologisch bedeutsame Protektion ($p=0,005$) durch KGF.

4.3.2.3 Funktionelle Auswirkungen des alveolären Ödems

Der Leser könnte berechtigterweise fragen, inwieweit sich $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 3,4% funktionell bemerkbar machen bzw. ob die Reduktion der $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 3,4% (PBS tx) auf 1,6% (KGF tx) eine funktionelle Relevanz besitzen kann?

Eine Arbeit von Fehrenbach et al. (1999b, p. 97) über die potentiellen Auswirkungen des I&R-assoziierten alveolären Ödems auf das pulmonale Oxygenierungspotential $\Delta P_{O_2}^*$ in isolierten Herz-Lungenpaketen der Ratte zeigte, dass die Volumendichte $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 3% im Bezug auf das pulmonale Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} einen kritischen Schwellenwert darstellte. Bei $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 3% lag ΔP_{O_2} noch im Normbereich. Wuchs $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ über den Wert von 3% hinaus, begann das pulmonale Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} steil abzufallen, sodass ΔP_{O_2} bei $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 10% bereits lediglich 40 mmHg betrug (Fehrenbach et al. 1999b). Projiziert man diese Erkenntnis auf die Daten der vorliegenden Arbeit, deutet das daraufhin, dass die PBS tx mit $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 3,4% ein eingeschränktes Oxygenierungspotential hätten. Die KGF tx hätten dagegen mit $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ von 1,6% keine Einschränkung der Oxygenierungsfunktion (zur genauen Abschätzung von ΔP_{O_2} s. 4.3.2.4).

4.3.2.4 Geschätztes pulmonales Oxygenierungspotential

Fehrenbach et al. (1999b) stellten in der in 4.3.2.3 bereits genannten quantitativen Studie am Modell des pulmonalen I&R-Schadens eine starke Korrelation ($r=-0,82$; $p<0,001$) zwischen der Volumendichte des alveolären Ödems im stereologisch definierten „PARENCHYMA“ $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ und dem pulmonalen Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} fest und drückten sie in der folgenden logarithmischen Beziehung aus: $\Delta P_{O_2} = 96 - 60 \times \log_{10} V_v(\text{alv. edema, PAR})$ [mmHg] (Fehrenbach et al. 1999b, p. 97).

* Oxygenierung des Perfusats: $\Delta P_{O_2} = P_{vO_2} - P_{aO_2}$, P_{vO_2} - O_2 -Partialdruck im Perfusat des linken Atriums, P_{aO_2} - O_2 -Partialdruck im desoxygenierten Perfusat („preload pool“) (Fehrenbach et al. 1999b).

Anhand dieser Formel und der in der vorliegenden Arbeit stereologisch ermittelten Volumendichten des alveolären Ödems wurde ΔP_{O_2} der linken transplantierten (PBS tx & KGF tx) und der ihnen korrespondierenden rechten nativen Lungen (PBS nat & KGF nat) abgeleitet und somit abgeschätzt.

Die auf den stereologischen Daten beruhende Ableitung von ΔP_{O_2} in den rechten nativen Lungen (PBS nat & KGF nat) lieferte theoretische Werte ohne einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,234$). ΔP_{O_2} betrug 129 ± 22 mmHg in PBS nat versus 120 ± 12 mmHg in KGF nat. Die Ableitung von ΔP_{O_2} in den Transplantaten (PBS tx & KGF tx) ergab theoretische Werte mit einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,005$). ΔP_{O_2} betrug 65 ± 8 mmHg in PBS tx versus 88 ± 15 mmHg in KGF tx.

Betrachtet man den theoretischen ΔP_{O_2} -Wert der PBS tx, 65 ± 8 mmHg und der korrespondierenden PBS nat, 129 ± 22 mmHg, stellt man fest, dass das alveoläre Ödem der PBS tx (dessen V_v mit 3,4% auf den ersten Blick keine beeindruckende Zahl darbot) potentiell eine bereits deutlich einschränkende (65 ± 8 mmHg!) Auswirkung auf ΔP_{O_2} haben dürfte. Das pulmonale Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} der PBS tx könnte somit im Vergleich zu den korrespondierenden PBS nat um die Hälfte abgefallen sein. Diese Daten belegen, dass der transplantationsassoziierte I&R-Schaden trotz der kurz gehaltenen Ischämiezeiten ausreichend war, um funktionell relevante Konsequenzen nach sich zu ziehen. Schließlich bestätigt das abgeleitete pulmonale Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} den pulmonal-protectiven Effekt durch KGF im Bezug auf das I&R-assoziierte alveoläre Ödem und das damit verbundene Oxygenierungsdefizit. An dieser Stelle sollte noch einmal betont werden, dass es hier bei ΔP_{O_2} um theoretisch abgeleitete Werte handelt. Aus diesem Grund sollte eine direkte Messung von ΔP_{O_2} der Gegenstand zukünftiger Studien sein.

4.3.2.5 Massenspezifische Volumina des alveolären Ödems

Um die in der Stereologie wohl bekannte Gefahr der „Referenzfalle“ („reference trap“, s. auch 1.6.2.4) auszuschließen, wurden in die Berechnung der massenspezifischen Volumina (s. Tab. 10, 11) die absoluten Volumina der untersuchten Strukturparameter integriert (s. 2.3.2). Die absoluten Volumina ergaben sich wiederum aus den stereologisch ermittelten Volumendichten $V_v(\text{Strukt}, \text{Ref})$ und den nach Scherle (1970) gemessenen Volumina der Lungen V_{LUNG} (s. 2.2.4.2).

Das Ermitteln der massenspezifischen Volumina des Strukturparameters „alv. edema“ ergab mit MSV(alv. edema) von $0,18 \pm 0,10$ [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] ebenfalls einen signifikanten Vorteil ($p=0,035$) für KGF tx gegenüber PBS tx mit MSV(alv. edema) von $0,32 \pm 0,11$ [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] (s. Tab. 10, Abb. 6).

4.3.3 Vermittlung des protektiven KGF-Effektes durch Surfactant

Eine naheliegende Erklärungsmöglichkeit wie der pulmonal-protektive Effekt von KGF vermittelt werden könnte, besteht in der durch KGF verbesserten Homöostase des Surfactantsystems (Ware & Matthay 2002, Fehrenbach et al. 2003). Zahlreiche Autoren beschrieben bereits eine KGF-induzierte Verbesserung der Funktion des endogenen Surfactantsystems (Fehrenbach et al. 2007, Sugahara et al. 1995, Morikawa et al. 2000, Yano et al. 2000, Barazzone et al. 1999, Guery et al. 1997).

Die protektive Wirkung des exogenen KGF in der vorliegenden Arbeit kann am ehesten durch die verbesserte Homöostase des endogenen Surfactantsystems erklärt werden. Die Untersuchungen der bronchoalveolären Flüssigkeiten (**BALF**) von Herrn Kuchenbuch (Sadovski, Kuchenbuch et al. 2008), die zu den Experimenten der vorliegenden Arbeit parallel verliefen und auf dem gleichen experimentellen Design beruhten, zeigten, dass die präoperative intratracheale Behandlung der Spender mit KGF zu einer Reduktion des Gesamtproteins in der BALF, einer Erhöhung der Fraktion des SP-C am Gesamtprotein der BALF und einer verbesserten biophysikalischen Surfactantaktivität führte. Die Plasmaproteine des alveolären Ödems sind imstande die Surfactantfunktion zu inhibieren (Seeger et al. 1993, Griesse 1999). SP-C erhöht die Resistenz des Surfactants gegenüber den inhibierenden Plasmaproteinen der Ödemflüssigkeit (Griesse 1999). SP-C ist außerdem ein biophysikalisch wirksames Surfactantprotein, das neben SP-B die Alveolarwände stabilisiert und dadurch die Alveolen offen und trocken hält (s. 1.4; Ochs 2006a, Weibel 2000, Fehrenbach 2001b).

4.4 Infiltration durch Makrophagen & T-Lymphozyten

Prince et al. (2001) zeigten auf zellulärer Ebene, dass KGF in den Zellen des humanen Atemwegsepithels potentiell einen anti-inflammatorischen Effekt ausüben kann. Über die Produktion eines noch nicht bekannten Epithelzellfaktors supprimiert KGF die T-Zell-abhängige Aktivierung der MF nach Knochenmarkstransplantation bei der Maus (Haddad et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit über die pulmonal-protective Wirkung von KGF wurde neben dem Hauptziel – der quantitativen Analyse des I&R-assoziierten alveolären Ödems - die I&R-assoziierte Infiltration der Lungen durch MF und T-Lymphozyten untersucht.

ED1 erkennt das CD68-artige lysosomale Membranantigen und markiert in den Rattenlungen alveoläre MF (Dijkstra et al. 1985, Schmidt et al. 2007, Damoiseaux et al. 1994, van den Berg et al. 2001). ED2 bindet an „hemoglobin scavenger“ Rezeptor CD163 und markiert in den Rattenlungen peribronchovaskuläre MF (Dijkstra et al. 1985, Schmidt et al. 2007, van den Berg et al. 2001). R73 erkennt ein Epitop der konstanten Determinante der β -Kette des α/β -T-Zell-Rezeptors (Hünig et al. 1989, Schmidt et al. 2007).

Die Quantifizierung der ED1-positiven Zellen (=Paraffinschnitte; s. Abb. 7) und der Vergleich der Zellzahlen zwischen PBS tx & KGF tx einerseits und PBS nat & KGF nat andererseits (s. Abb. 10) ergab keine signifikanten Unterschiede.

Vereinzelte ED2- und R73-positive Zellen (=Gefrierschnitte, s. Abb. 8, 9) fanden sich sowohl in PBS tx & KGF tx als auch in PBS nat & KGF nat. Die Quantifizierung der ED2- und R73-positiven Zellen war auf Grund der für die Gefrierschnitte üblichen unzureichenden Gewebequalität nicht möglich.

Die Tatsache, dass es hinsichtlich der ED1-positiven Zellen zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede gab, als auch die Tatsache der insgesamt schwachen Infiltration durch ED2- und R73-positive Zellen selbst in den transplantierten Kontrolllungen (PBS tx) lässt sich am ehesten durch die Ischämiezeiten erklären, die in der vorliegenden Arbeit an das Konzept von LDLLT angepasst und aus diesem Grund möglichst kurz gehalten wurden (s. 2.2.3; Date et al. 2003, Kozower et al. 2006).

4.5 Exogener KGF & allogene Lungentransplantate der Ratte

Die immunhistologischen Untersuchungen im Kontext der allogenen LTx* bei Ratte von Hirschburger et al. (2009), die auf die Experimente der vorliegenden Arbeit folgten, konnten jedoch keine protective Wirkung von KGF nachweisen. Die Ausprägung der Infiltration durch MF und T-Lymphozyten war sowohl in den PBS- als auch in den KGF-behandelten Lungentransplantaten gleich stark. Abgesehen davon zeigte am Tag 4 nach der allogenen LTx das Alveolarepithel der KGF- im Vergleich zu den PBS-behandelten Lungentransplantaten eine insgesamt deutlich erhöhte Expression der MHC-II-Antigene.

* Für die allogene LTx in Ratte wurden hier 2 unterschiedliche Stammkombinationen eingesetzt – eine mit starker (Dark Agouti → Lewis) und eine andere mit weniger starker (Fischer 344 → Wistar Kyoto) Inkompatibilität (Hirschburger et al. 2009).

Mehrere Autoren beschrieben bereits, dass AE II fähig sind, MHC-II-Antigene zu exprimieren, Antigene zu präsentieren und dadurch die Aktivierung der T-Zellen zu induzieren (Debbabi et al. 2005, Fehrenbach 2001b, Zissel et al. 2000). Die Hochregulierung der Expression von MHC-II-Antigenen in den AE II erfolgt z.B. unter Einwirkung von INF- γ (Harbeck et al. 1988, Schneeberger et al. 1986).

In den Untersuchungen von Hirschburger et al. (2009) führte vermutlich die KGF-induzierte Hyperplasie der AE II in Verbindung mit den pro-inflammatorischen Zytokinen (die in der Situation nach allogener LTx typischerweise produziert werden) zu der insgesamt erhöhten Expression der MHC-II-Antigene. Es wird vermutet, dass die tierexperimentell bereits mehrfach nachgewiesene pulmonal-protective KGF-Wirkung (Ware & Matthay 2002) im Zusammenhang mit der allogenen LTx am ehesten durch die starke MHC-II-Expression, die Aktivierung der T-Zellen des Empfängers und die dadurch erhöhte Alloreaktivität aufgehoben wird (Hirschburger et al. 2009).

4.6 Schlussfolgerungen

Die KGF tx zeigten sowohl in den für die Stereologie als auch in den für die Immunhistologie vorgesehenen experimentellen Reihen eine deutliche Hyperplasie der AE II (Abb. 4,7,8,9). Dieser Befund war mit den Ergebnissen zahlreicher Publikationen (Ware & Matthay 2002) vereinbar und belegte, dass das Behandlungskonzept in Form von intratrachealer Instillation in der vorliegenden Arbeit technisch erfolgreich umgesetzt werden konnte.

Die Quantifizierung des alveolären Lungenödems erfolgte mit Hilfe der „design-based“ Stereologie. Die zahlreichen Anforderungen, die „design-based“ Stereologie einem stellt, wurden in dieser Arbeit sorgfältig erfüllt und garantierten somit valide und zuverlässige Daten (s. 1.6.2, 2.2.4). Die ermittelten $V_v(\text{alv. edema, PAR})$, $MSV(\text{alv. edema})$ sowie die Fraktion „alveolar edema“/„septal tissue“ belegten einen signifikanten sowie biologisch bedeutsamen pulmonal-protectiven Effekt durch den intratracheal applizierten KGF. Auch das theoretisch abgeleitete und somit abgeschätzte pulmonale Oxygenierungspotential ΔP_{O_2} zeigte einen signifikanten Vorsprung der KGF tx gegenüber den PBS tx (s. 4.3.2.4).

Die experimentellen Untersuchungen zahlreicher Autoren zeigten bereits, dass KGF in erster Linie dann eine effektive pulmonale Protektion gewährt, wenn die Tiere 2-3 Tage vor der Lungenschädigung behandelt werden (Ware & Matthay 2002). Projizierte man diesen Aspekt während der Experimentplanung auf die klinische Situation der LTx beim Menschen, erschien die Vorbehandlung im Kontext der Lungenspende von einem

Verstorbenen nicht möglich. Im Falle von LDLLT dagegen (Date et al. 2003, Kozower et al. 2006, Sweet 2006) wäre die Behandlung des Spenders 2-3 Tage vor der geplanten LTx durchaus denkbar. Die in dieser Arbeit nachgewiesene präventive Wirkung von KGF im Bezug auf das I&R-assoziierte alveoläre Ödem hätte somit hypothetisch vor allem im Kontext von LDLLT eine klinische Anwendung finden können. Bei einer LDLLT hätten von der KGF-Behandlung außerdem nicht nur die Empfänger, sondern auch die Spender profitieren können, da exogener KGF in Tierexperimenten das kompensatorische Lungewachstum nach einer Pneumonektomie fördert (Kaza et al. 2002).

Die Untersuchungen von Hirschburger et al. (2009) im Kontext der allogenen LTx bei Ratte konnten jedoch keine pulmonal-protektive Wirkung durch exogenen KGF nachweisen. Die mehrfach beschriebenen anti-inflammatorischen und protektiven KGF-Eigenschaften konnten in dem allogenen LTx-Modell bei Ratte die akute Abstoßung und die Zerstörung der Lungentransplantate nicht abschwächen. Im Gegenteil führte die KGF-induzierte Hyperplasie der AE II zu einer insgesamt erhöhten MHC-II-Expression, dadurch am ehesten zur Aktivierung der T-Zellen des Empfängers und somit zu einer gesteigerten Alloreaktivität. Aus diesem Grund wird die pulmonal-protektive Wirkung von KGF bei der LTx - die in einem allogenen Modus erfolgen muss - keine klinische Anwendung finden können.

Sofern es sich nicht um den Einsatz im Rahmen einer allogenen LTx handelt, wäre es möglich, dass die Verwendung von KGF im klinischen Bereich bei ALI bzw. ARDS die Überlebenschancen der betroffenen Patienten auf den Intensivstationen verbessert. Auch bei Operationen unter Verwendung des kardio-pulmonalen Bypasses, die einen I&R-Schaden der Lungen unweigerlich zur Folge haben, könnte die pulmonal-protektive Wirkung von KGF gegebenenfalls genutzt werden. Demzufolge sind weitere Studien auf diesem Gebiet sehr sinnvoll.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein Beitrag zur Erforschung der präventiv-therapeutischen Möglichkeiten durch KGF im Bezug auf den pulmonalen transplantationsassoziierten I&R-Schaden geleistet.

5 Zusammenfassung

Der Schaden durch die transplantationsassoziierte Ischämie & Reperfusion (**I&R**) stellt einen bekannten Auslöser der Lungeninsuffizienz („primary lung graft dysfunction“) in den ersten 72 h nach Lungentransplantation (**LTx**) dar. Zahlreiche tierexperimentelle Modelle der akuten Lungenschädigung, denen eine Vorbehandlung mit Keratinozytenwachstumsfaktor (**KGF**) gemeinsam war, belegten bereits mehrfach den pulmonal-protectiven Effekt von KGF.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob im Zuge einer isogenen LTx eine lokale Vorbehandlung des Spenders mit dem rekombinanten humanen Δ N23-trunkierten KGF (rHu Δ N23-KGF, Palifermin) in der Lage ist, das I&R-assoziierte Alveolarödem zu reduzieren.

Zur Durchführung der isogenen orthotopen linksseitigen LTx wurden männliche Lewis-Inzuchtratten eingesetzt. Die Behandlung der Transplantatspender mit rHu Δ N23-KGF (5 mg/kg KG; n=6) erfolgte via intratracheale Instillation und fand an den Tagen 3 und 2 vor der geplanten LTx statt. Bei den Spendertieren der Kontrollgruppe (n=7) führte man die Behandlung mit äquivalenten Volumina der PBS-Lösung („phosphate buffered saline“) durch. Die Entnahme der Lungen für die geplanten Untersuchungen erfolgte am Tag 1 nach der LTx. Durch die intravasale Perfusionsfixierung blieben die Alveolarräume unbeeinträchtigt. Die quantitative lichtmikroskopische Analyse des alveolären Ödems erfolgte mit Hilfe der „design-based“ Stereologie unter Einsatz von „systematic uniform random sampling“ (SURS).

Die mit rHu Δ N23-KGF behandelten Lungentransplantate (**KGF tx**) zeigten eine deutliche Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II. Dieser Befund belegt, dass das Behandlungskonzept in Form der intratrachealen Instillation technisch erfolgreich umgesetzt werden konnte. Die Volumendichte des alveolären Ödems in seinem Referenzraum „PARENCHYMA“ $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ betrug in den mit PBS behandelten Lungentransplantaten (**PBS tx**) $3,4 \pm 1,1\%^*$ versus $1,6 \pm 0,8\%^*$ in den KGF tx ($p=0,005$). Das massenspezifische Volumen des alveolären Ödems $MSV(\text{alv. edema})$ betrug in den PBS tx $0,32 \pm 0,11^*$ [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] versus $0,18 \pm 0,10^*$ [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] in den KGF tx ($p=0,035$).

* Mittelwert \pm Standardabweichung

Damit wurde gezeigt, dass die intratracheale Vorbehandlung des Spenders mit rHuΔN23-KGF das I&R-assoziierte Alveolarödem im Lungentransplantat signifikant reduziert. Eine naheliegende Erklärungsmöglichkeit wie der pulmonal-protektive Effekt von KGF vermittelt wird, besteht am ehesten in der durch rHuΔN23-KGF verbesserten Homöostase des Surfactantsystems.

Eine intratracheale Vorbehandlung des Spenders mit KGF könnte insbesondere im Kontext der Lobar-Lebendspende („living donor lobar lung transplantation“, **LDLLT**) eine viel versprechende Strategie der Prävention des I&R-assoziierten Alveolarödems liefern. Bei LDLLT würde nicht nur der Empfänger, sondern auch der Spender profitieren, da exogener KGF in Tierexperimenten das kompensatorische Lungenwachstum nach einer Pneumon-ektomie fördert. Auf Grund der Untersuchungen von Hirschburger et al. (2009) zur allogenen LTx bei der Ratte, die keinen Vorteil einer Spenderbehandlung mit rHuΔN23-KGF zeigten, ist diese Anwendung jedoch in Frage gestellt, da eine LDLLT immer eine allogene Transplantation ist.

Sofern es sich nicht um den Einsatz im Rahmen einer allogenen LTx handelt, wäre es möglich, dass KGF die Überlebenschancen der Patienten mit akuter Lungenschädigung verbessert. Auch bei Operationen unter Verwendung des kardio-pulmonalen Bypasses, die einen I&R-Schaden der Lungen unweigerlich zur Folge haben, könnte die pulmonal-protektive Wirkung von KGF genutzt werden.

5 Summary

Ischemia & reperfusion injury (**I&R**) is a well-known cause for primary lung graft dysfunction during the first 72 h after lung transplantation (**LTx**). Pre-treatment with Keratinocyte Growth Factor (**KGF**) has been used to prevent different kinds of experimental acute lung injury in rodents.

The main purpose of this study was to test whether a local pre-treatment of the donor lung with Δ N23-truncated KGF (**rHu Δ N23-KGF**, Palifermin) in the course of isogeneic LTx, reduces I&R-associated alveolar edema.

Male Lewis inbred rats were used for isogeneic orthotopic transplantation of left lungs. Donor pre-treatment via intratracheal instillation of rHu Δ N23-KGF (5 mg/kg KG; n=6) was performed on day 2 and 3 before scheduled LTx. Control animals (n=7) received an equivalent volume of phosphate buffered saline (**PBS**). Graft recipients were sacrificed 1 day after LTx. Due the fixation via vascular perfusion, the alveolar space remained intact. Qualitative analysis of alveolar edema was performed by means of design-based stereology using the principle of systematic uniform random sampling.

Histological sections of lung isografts originated from donors, which were treated with rHu Δ N23-KGF (**KGF tx**), revealed pronounced hyperplasia of type II pneumocytes. This is the typical feature of rat lungs treated with KGF, described by several authors, which indicated that the pre-treatment via intratracheal instillation was successful. The volume density of alveolar edema in its reference space “PARENCHYMA” $V_v(\text{alv. edema, PAR})$ in isografts from control treated donors (**PBS tx**) amounted to $3.4 \pm 1.1\%$ * versus $1.6 \pm 0.8\%$ * in KGF tx ($p=0.005$). The mass-specific volume of the alveolar edema $MSV(\text{alv. edema})$ in PBS tx amounted to 0.32 ± 0.11 * [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] versus 0.18 ± 0.10 * [$\text{mm}^3/\text{g KG}$] in KGF tx ($p=0.035$).

The present study has shown that donor pre-treatment with rHu Δ N23-KGF via intratracheal instillation significantly protects lung isografts against I&R-associated alveolar edema. This effect appears to be mediated by an improved surfactant homeostasis.

Donor pre-treatment with KGF via intratracheal instillation could be a promising strategy for the prevention of I&R-associated alveolar edema, especially in living donor lobar lung transplantation (**LDLLT**). Furthermore, in case of LDLLT, the pre-treatment with KGF could be beneficial not only for donors but also for recipients, because exogenous KGF has been shown to enhance post-pneumectomy compensatory lung growth in adult rats.

* mean \pm standard deviation

The study on allogeneic LTx in the rat by Hirschburger et al. (2009), however, has not shown any beneficial effects after donor pre-treatment with KGF. As LDLLT is always an allogeneic transplantation, donor pre-treatment with KGF is unlikely to be successful. Nevertheless, KGF might increase survival rates of patients with acute lung injury. Furthermore, KGF might be used in order to protect against lung injury due to I&R, which is inevitable in operations involving cardio-pulmonary bypass.

6 Abkürzungs-, Abbildungs- & Tabellenverzeichnisse

6.1 Abkürzungen

AA	Flächendichte
Abb.	Abbildung
AE I	Alveolarepithelzellen Typ I
AE II	Alveolarepithelzellen Typ II
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
-D	-dimensional
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DE	Deutschland
engl.	englisch
et al.	et alii
FiO ₂	inspiratorische O ₂ -Fraktion
FGF	fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	FGF-Rezeptor
G	spezifisches Gewicht
GA	gauge
griech.	griechisch
h	hour, Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish-peroxidase
IE	internationale Einheit
INF- γ	Interferon- γ
I&R	Ischämie & Reperfusion
KG	Körpergewicht
KGF	keratinocyte growth factor, Keratinozytenwachstumsfaktor
KGF nat (=interne Kontrollgruppe)	rechte native Lungen der Empfänger der KGF-Transplantate
KGF tx (=Versuchsgruppe)	mit KGF behandelte, transplantierte linke Lungen
LDLLT	living donor lobar lung transplantation, Lobar-Lebendspende
LEW	Lewis

LL	Längendichte
LT _x	Lungentransplantation
math.	mathematisch
MF	Makrophagen
MHC	major histocompatibility complex
min	minute, Minute
MSV	mass-specific volume, massenspezifisches Volumen
n	Anzahl der Versuchstiere
nat	nativ (=nicht transplantierte, rechte Empfängerlungen)
p.	page, Seite
p.a.	pro analysi, zur Analyse
P _{O₂}	O ₂ -Partialdruck
ΔP _{O₂}	pulmonales Oxygenierungspotential (s. 4.3.2.3, 4.3.2.4)
PAR	das stereologisch definierte „PARENCHYMA“ (s. 1.6.3)
PBS	Phosphate buffered saline
PBS nat (=interne Kontrollgruppe)	rechte native Lungen der Empfänger der PBS-Transplantate
PBS tx (=Kontrollgruppe)	mit PBS behandelte, transplantierte linke Lungen
PGD	primary graft dysfunction
pp.	pages, Seiten
PP	Punktdichte
Ref	Referenzraum (s. Abb. 1)
rHuΔN23-KGF	N-terminal trunkierte Form des rekombinanten humanen KGF
RNS	reactive nitrogen species, reaktive Stickstoffspezies
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SP	Surfactantprotein
Strukt	Strukturparameter (s. Abb. 1)
SURS	systematic uniform random sampling
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF-α	tumor necrosis factor-α
tx	transplantiert (=linke Lungen)
ugs.	umgangssprachlich

ü.N.	über Nacht
V	absolutes Volumen
VE	voll entsalzt
V _v	volume density, Volumendichte, -fraktion, -anteil
V _v (alv. edema, PAR)	Volumendichte des Strukturparameters „alveolar edema“ in seinem Referenzraum „PARENCHYMA“
V _v (Strukt, Ref)	Volumendichte eines Strukturparameters in seinem Referenzraum
W _R	Körpergewicht des Spendertieres

6.2 Abbildungen

Abb. 1	Abfolge der stereologisch-lichtmikroskopischen Analyse	30
Abb. 2	„Point counting“: Level I	33
Abb. 3	„Point counting“: Level II	34
Abb. 4	Histomorphologie der Lungentransplantate	36
Abb. 5	Alveoläres Ödem: Volumendichten	41
Abb. 6	Alveoläres Ödem: Massenspezifische Volumina	42
Abb. 7	Immunhistologie mit dem Antikörper ED1	43
Abb. 8	Immunhistologie mit dem Antikörper ED2	44
Abb. 9	Immunhistologie mit dem Antikörper R73	45
Abb. 10	Alveoläre Makrophagen: Zellzahlen	46

6.3 Tabellen

Tab. 1	Materialien, Reagenzien & Medikamente	16
Tab. 2	Pufferlösungen	19
Tab. 3	Aufbereitung der Lungen für die Stereologie	24
Tab. 4	Einbettung der Lungen in Paraffin	25
Tab. 5	Silanisierung der Objektträger	26
Tab. 6	Entparaffinierung der Lungenschnitte	26
Tab. 7	Immunhistochemische Färbung	27
Tab. 8	Volumendichten: Lungentransplantate	37
Tab. 9	Volumendichten: Native Lungen	37
Tab. 10	Massenspezifische Volumina: Lungentransplantate	39
Tab. 11	Massenspezifische Volumina: Native Lungen	39

7 Literaturverzeichnis

Adamson IYR & Bakowska J (1999) Relationship of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor levels in rat lung lavage fluid to epithelial cell regeneration after bleomycin. *Am J Pathol*, 155: 949-954.

Al Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, Ross C, Blecha F, Dinanuer M & Fisher AB (1998) Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ Res*, 83: 730-737.

ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L & Slutsky AS (2012) Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *JAMA*, 307: 2526-2533.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL & Levine BE (1967) Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2: 319-323.

Bachofen H, Ammann A, Wangenstein D & Weibel ER (1982) Perfusion fixation of lungs for structure-function analysis: credits and limitations. *J Appl Physiol*, 53: 528-533.

Bachofen M & Weibel ER (1977) Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis*, 116: 589-615.

Bachofen M & Weibel ER (1982) Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*, 3: 35-56.

Baddeley A (1993) Stereology and survey sampling theory. *Bull Intern Statis Inst, Proceedings 49th Session (Florence 1993)*, 52: 435-449.

Baddeley A & Vedel Jensen EB (2004) Stereology for statisticians. Monographs on statistics and applied probability 103. *Chapman and Hall/CRC*.

Barazzone C, Donati YR, Rochat AF, Vesin C, Kan CD, Pache JC & Piguet PF (1999) Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice. *Am J Pathol*, 154: 1479-1487.

Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF & Hsu SM (1996) Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol*, 149: 845-852.

Beaven AW & Shea TC (2006) Palifermin: a keratinocyte growth factor that reduces oral mucositis after stem cell transplant for haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother*, 7: 2287-2299.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A & Spragg R (1994) The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*, 149: 818-824.

Bittner HB, Kendall SW, Chen EP, Craig D & van Trigt P (1995) The effects of brain death on cardiopulmonary hemodynamics and pulmonary blood flow characteristics. *Chest*, 108: 1358-1363.

Borok Z, Danto SI, Dimen LL, Zhang XL & Lubman RL (1998) Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar epithelial cells: upregulation of active ion transport by KGF. *Am J Physiol*, 274: L149-L158.

Braendgaard H & Gundersen HJG (1986) The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods*, 18: 39-78.

Brauchle M, Angermeyer K, Hubner G & Werner S (1994) Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene*, 9: 3199-3204.

Casley-Smith JR (1988) Expressing stereological results „per cm³“ is not enough. *J Pathol*, 156: 263-265.

Charafeddine L, D'Angio CT, Richards JL, Stripp BR, Finkelstein JN, Orlowski CC, LoMonaco MB, Paxhia A & Ryan RM (1999) Hyperoxia increases keratinocyte growth factor mRNA expression in neonatal rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 276: L105-L113.

Chedid M, Rubin JS, Csaky KG & Aaronson SA (1994) Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem*, 269: 10753-10757.

Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M & Weill D (2005b) Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction Part II: Definition. A Consensus Statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 24: 1454-1459.

Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J & Hertz MI (2012) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report - 2012. *J Heart Lung Transplant*, 31: 1073-1086.

Christie JD, van Raemdonck D, de Perrot M, Barr M, Keshavjee S, Arcasoy S, Orens J & the Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction (2005a) Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction Part I: Introduction and Methods. *J Heart Lung Transplant*, 24: 1451-1453.

Clements JA (1961) Pulmonary edema and permeability of alveolar membranes. *Arch Environ Health*, 2: 104-107.

Cochran WG (1977) Sampling techniques. 3. Auflage. *Wiley*.

Crouch E & Wright JR (2001) Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol*, 63: 521-554.

Cruz-Orive LM & Weibel ER (1981) Sampling designs for stereology. *J Microsc*, 122: 235-257.

Damoiseaux JGMC, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG & Dijkstra CD (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology*, 83: 140-147.

Danilenko DM (1999) Preclinical and early clinical development of keratinocyte growth factor, an epithelial-specific tissue growth factor. *Toxicol Pathol*, 27: 64-71.

Date H, Aoe M, Nagahiro I, Sano Y, Andou A, Matsubara H, Goto K, Tedoriya T & Shimizu N (2003) Living-donor lobar lung transplantation for various lung diseases. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126: 476-481.

Debbabi H, Ghosh S, Kamath AB, Alt J, deMello DE, Dunsmore S & Behar SM (2005) Primary type II alveolar epithelial cells present microbial antigens to antigen-specific CD4⁺ T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289: L274-L279.

de Perrot M, Liu M, Waddell TK & Keshavjee S (2003) Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 490-511.

Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P & Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*, 54: 589-599.

Dunnill MS (1962) Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax*, 17: 320-328.

Eckenhoff RG, Dodia C, Tan ZT & Fisher AB (1992) Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol*, 72: 1454-1460.

Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF & Ward PA (1997) Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*, 150: 1773-1784.

Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF & Ward PA (1995) Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of the rat lung. *J Surg Res*, 58: 713-718.

Erasmus ME, Hofstede GJ, Petersen AH, Batenburg JJ, Haagsman HP, Bambang Oetomo SB & Prop J (2002) SP-A-enriched surfactant for treatment of rat lung transplants with SP-A deficiency after storage and reperfusion. *Transplantation*, 73: 348-352.

Erasmus ME, Petersen AH, Hofstede GJ, Haagsman HP, Bambang Oetomo SB & Prop J (1996) Surfactant treatment before reperfusion improves the immediate function of lung transplants in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 665-670.

Fehrenbach A, Bube C, Hohlfeld JM, Stevens P, Tschernig T, Hoymann HG, Krug N & Fehrenbach H (2003) Surfactant homeostasis is maintained in vivo during keratinocyte growth factor-induced rat lung type II cell hyperplasia. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 1264-1270.

Fehrenbach A, Fehrenbach H, Wittwer T, Ochs M, Wahlers T & Richter J (2001a) Evaluation of pulmonary edema: stereological versus gravimetric analysis. *Eur Surg Res*, 33: 270-278.

Fehrenbach A, Ochs M, Warnecke T, Wahlers T, Wittwer T, Schmiedl A, Elki S, Meyer D, Richter J & Fehrenbach H (2000a) Beneficial effect of lung preservation is related to ultrastructural integrity of tubular myelin after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 2058-2065.

Fehrenbach A, Wittwer T, Meyer D, von Vietinghoff S, Viehöver M, Fehrenbach H, Richter J & Wahlers T (2001c) Nitroglycerin alters alveolar type II cell ultrastructure after ischemia and reperfusion. *J Heart Lung Transplant*, 20: 876-888.

Fehrenbach H (2001b) Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*, 2: 33-46.

Fehrenbach H, Fehrenbach A, Dietzel E, Tschernig T, Krug N, Grau V & Hohlfeld JM (2007) Effects of keratinocyte growth factor on intra-alveolar surfactant fixed in situ: quantitative ultrastructural and immunoelectron microscopic analysis. *Anat Rec (Hoboken)*, 290: 974-980.

Fehrenbach H, Fehrenbach A, Pan T, Kasper M & Mason RJ (2002) Keratinocyte growth factor-induced proliferation of rat airway epithelium is restricted to Clara cells in vivo. *Eur Respir J*, 20: 1185-1197.

Fehrenbach H, Kasper M, Koslowski R, Pan T, Schuh D, Müller M & Mason RJ (2000b) Alveolar epithelial type II cell apoptosis in vivo during resolution of keratinocyte growth factor-induced hyperplasia in the rat. *Histochem Cell Biol*, 114: 49-61.

Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, Müller M & Mason RJ (1999a) Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J*, 14: 534-544.

Fehrenbach H & Ochs M (1998) Studying lung ultrastructure. In: Uhlig S & Taylor AE. Methods in pulmonary research. *Birkhäuser*, 429-454.

Fehrenbach H, Schepelmann D, Albes JM, Bando T, Fischer F, Fehrenbach A, Stolte N, Wahlers T & Richter J (1999b) Pulmonary ischemia/reperfusion injury: a quantitative study of structure and function in isolated heart-lungs of the rat. *Anat Rec*, 255: 84-99.

Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D & Aaronson SA (1989) Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, 245: 752-755.

Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, Kern JA & Kron IL (2001a) Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121: 1069-1075.

Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR, Robbins MK & Kron IL (2002) Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of a late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg*, 73: 1041-1048.

Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA & Kron IL (2001b) Pulmonary macrophages are involved in reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 71: 1134 -1139.

Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, Ayene I & Eckenhoff RG (1991) Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest*, 88: 674-679.

Gehr P, Bachofen M & Weibel ER (1978) The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol*, 32: 121-140.

Glagolev AA (1934) Quantitative analysis with the microscope by the point method. *Engineering and Mining Journal*, 135: 399-400.

Griese M (1999) Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 13: 1455-1476.

Grover FL, Fullerton DA, Zamora MR, Mills C, Ackerman B, Badesch D, Brown JM, Campbell DN, Chetham P, Dhaliwal A, Diercks M, Kinnard T, Niejadlik K & Ochs M (1997) The past, present, and future of lung transplantation. *Am J Surg*, 173: 523-533.

Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR & Nelson S (1997) Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, 55: 1777-1784.

Gundersen HJG & Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147: 229-263.

Gundersen HJG & Osterby R (1981) Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or „do more less well !“. *J Microsc*, 121: 65-73.

Günther A, Balser M, Schmidt R, Markart P, Olk A, Börgermann J, Splittgerber FH, Seeger W & Friedrich I (2004) Surfactant abnormalities after single lung transplantation in dogs: impact of bronchoscopic surfactant administration. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127: 344-354.

- Haddad IY, Milla C, Yang S, Panoskaltsis-Mortari A, Hawgood S, Lacey DL & Blazar BR (2003) Surfactant protein A is a required mediator of keratinocyte growth factor after experimental marrow transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285: L602-L610.
- Haddad IY, Panoskaltsis-Mortari A, Ingbar DH, Resnik ER, Yang S, Farrell CL, Lacey DL, Cornfield DN & Blazar BR (1999) Interactions of keratinocyte growth factor with a nitrating species after marrow transplantation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 277: L391-L400.
- Harbeck RJ, Gegen NW, Struhar D & Mason R (1988) Class II molecules on rat alveolar type II epithelial cells. *Cell Immunol*, 111: 139-147.
- Haug H, Kühl S, Mecke E, Sass N & Wasner K (1984) The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain. *J Hirnforsch*, 25: 353-374.
- Hirschburger M, Obert M, Traupe H, Kuchenbuch T, Padberg W, Fehrenbach H & Grau V (2009) Treatment with keratinocyte growth factor does not improve lung allograft survival in the rat. *Langenbecks Arch Surg*, 394:133-141.
- Hohlfeld JM, Strüber M, Ahlf K, Hoepfer MM, Fraund S, Krug N, Warnecke G, Harringer W, Haverich A & Fabel H (1999) Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischaemia-reperfusion injury in minipigs. *Eur Respir J*, 13: 1037-1043.
- Hohlfeld JM, Tiryaki E, Hamm H, Hoymann HG, Krug N, Haverich A & Fabel H (1998) Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 706-712.
- Howard CV & Reed MG (1998) Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy. 1. Auflage. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks, *Bios Scientific Publishers*.
- Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M & Weibel ER (2010) An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*, 181: 394-418.
- Hsu E, Osslund T, Nybo R, Chen BL, Kenney WC, Morris CF, Arakawa T & Narhi LO (2006) Enhanced stability of recombinant keratinocyte growth factor by mutagenesis. *Protein Eng Des Sel*, 19: 147-153.
- Hünig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A & Tiefenthaler G (1989) A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med*, 169: 73-86.
- Igarashi M, Finch PW & Aaronson SA (1998) Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem*, 273: 13230-13235.
- Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, Tribble CG & Laubach VE (2002) Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation*, 106: I120-I124.
- Kendall MG & Moran PAP (1963) Geometrical probability. *Charles Griffin and Company*.
- Khan SU, Salloum J, O'Donovan PB, Mascha EJ, Mehta AC, Matthay MA & Arroliga AC (1999) Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest*, 116: 187-194.

Kim CF (2007) Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293: L1092-L1098.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT & Jacks T (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 121: 823-835.

King RC, Binns OAR, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, Tribble CG & Kron IL (2000) Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg*, 69: 1681-1685.

Kozower BD, Sweet SC, de la Morena M, Schuler P, Guthrie TJ, Patterson GA, Gandhi SK & Huddleston CB (2006) Living donor lobar grafts improve pediatric lung retransplantation survival. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 131: 1142-1147.

Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS, Hancock WW & Tilney NL (2000) Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation*, 69: 405-410.

Lansman JB (1988) Endothelial mechanosensors: going with the flow. *Nature*, 331: 481-482.

Lee JC & Christie JD (2009) Primary graft dysfunction. *Proc Am Thorac Sci*, 6: 39-46.

Maina JN & West JB (2004) Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol Rev*, 85: 811-844.

Matheron G (1972) Random sets theory and its applications to stereology. *J. Microsc*, 95: 15-23.

Matthay MA & Ingbar DH (1998) Pulmonary edema. In: Lung biology in health and disease. *Marcel Dekker*.

Mayhew TM (1991) The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol*, 76: 639-665.

McCormack FX & Whitsett JA (2002) The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest*, 109: 707-712.

McDonnell AM & Lenz KL (2007) Palifermin: role in the prevention of chemotherapy- and radiation-induced mucositis. *Ann Pharmacother*, 41: 86-94.

Miles RE & Davy PJ (1976) Precise and general conditions for the validity of a comprehensive set of stereological fundamental formulae. *J. Microsc*, 107: 211-226.

Miles RE & Serra J (1978) Geometrical probability and biological structures: Buffon's 200th anniversary. Lecture notes in biomathematics. *Springer*.

Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K & Kawashima Y (1989) Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 97: 578-581.

Morikawa O, Walker TA, Nielsen LD, Pan T, Cook JL & Mason RJ (2000) Effect of adenovector-mediated gene transfer of keratinocyte growth factor on the proliferation of alveolar type II cells *in vitro* and *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23: 626-635.

Mouton PR (2005) History of modern stereology. International Brain Research Organization. www.ibro.org.

- Mouton PR (2002) Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists. *Johns Hopkins University Press*.
- Naka Y, Marsh HC, Scesney SM, Oz MC & Pinsky DJ (1997) Complement activation as a cause for primary graft failure in an isogeneic rat model of hypothermic lung preservation and transplantation. *Transplantation*, 64: 1248-1255.
- Novick RJ, Gehman KE, Ali IS & Lee J (1996) Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg*, 62: 302-314.
- Ochs M (2006a) A brief update on lung stereology. *J Microsc*, 222: 188-200.
- Ochs M (2006b) Stereological analysis of acute lung injury. *Eur Respir Rev*, 15: 115-121.
- Ochs M, Fehrenbach H, Nenadic I, Bando T, Fehrenbach A, Schepelmann D, Albes JM, Wahlers T & Richter J (2000) Preservation of intraalveolar surfactant in a rat lung ischaemia/reperfusion injury model. *Eur Respir J*, 15: 526-531.
- Ochs M, Nenadic I, Fehrenbach A, Albes JM, Wahlers T, Richter J & Fehrenbach H (1999) Ultrastructural alterations in intraalveolar surfactant subtypes after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 160: 718-724.
- Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J & Gundersen HJG (2004) The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 169: 120-124.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G & Goldfarb M (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, 271: 15292-15297.
- Oswari J, Matthay MA & Margulies SS (2001) Keratinocyte growth factor reduces alveolar epithelial susceptibility to in vitro mechanical deformation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281: L1068-L1077.
- Panos RJ, Bak PM, Simone WS, Rubin JS & Smith LG (1995) Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J Clin Invest*, 96: 2026-2033.
- Panoskaltis-Mortari A, Lacey DL, Vallera DA & Blazar BR (1998) Keratinocyte growth factor administered before conditioning ameliorates graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood*, 92: 3960-3967.
- Pinkerton KE, Gehr P & Crapo JD (1992) Architecture and cellular composition of the air-blood barrier. In: Parent RA (ed.). *Comparative biology of the normal lung*. Boca Raton, CRC Press. 121-128.
- Plopper CG, Nishio SJ, Alley JL, Kass P & Hyde DM (1992) The role of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell as the progenitor cell during bronchiolar epithelial differentiation in the perinatal rabbit lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7: 606-613.
- Prince LS, Karp PH, Moninger TO & Welsh MJ (2001) KGF alters gene expression in human airway epithelia: potential regulation of the inflammatory response. *Physiol Genomics*, 6: 81-89.
- Putman E, van Golde LM & Haagsman HP (1997) Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung*, 175: 75-103.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM & Freeman BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 288: 481-487.

- Ranieri VM et al. (2012) s. unter ARDS Definition Task Force.
- Roberts N, Puddephat MJ & McNulty V (2000) The benefit of stereology for quantitative radiology. *Br J Radiol*, 73: 679-697.
- Röhrig B, du Prel JB & Blettner M (2009) Studiendesign in der medizinischen Forschung. *Dtsch Arztebl Int*, 106: 184-189.
- Rosiwal A (1898) Über geometrische Gesteinsanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffernmäßigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineralbestandteile gemengter Gesteine. *Verh K K Geol Reichsanst Wien*, 143-175.
- Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S & Aaronson SA (1989) Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 802-806.
- Sadovski J, Kuchenbuch T, Ruppert C, Fehrenbach A, Hirschburger M, Padberg W, Günther A, Hohlfeld JM, Fehrenbach H & Grau V (2008) Keratinocyte growth factor prevents intra-alveolar oedema in experimental lung isografts. *Eur Respir J*, 31: 21-28.
- Santaló LA (1976) Integral Geometry and Geometrical Probability. *Addison-Wesley*.
- Scherle W (1970) A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, 26: 57-60.
- Schmidt A, Sucke J, Fuchs-Moll G, Freitag P, Hirschburger M, Kaufmann A, Garn H, Padberg W & Grau V (2007) Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J Leukoc Biol*, 81: 186-194.
- Schneeberger EE, DeFerrari M, Skoskiewicz MJ, Russell PS & Colvin RB (1986) Induction of MHC-determined antigens in the lung by interferon-gamma. *Lab Invest*, 55: 138-144.
- Seeger W, Grube C, Günther A & Schmidt R (1993) Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur Respir J*, 6: 971-977.
- Stoyan D, Kendall WS & Mecke J (1995) Stochastic geometry and its applications. 2. Auflage. *Wiley*.
- Strüber M, Hirt SW, Cremer J, Harringer W & Haverich A (1999) Surfactant replacement in reperfusion injury after clinical lung transplantation. *Intensive Care Med*, 25: 862-864.
- Stuart A (1984) The ideas of sampling. *Charles Griffin*.
- Sugahara K, Iyama K, Kuroda M & Sano K (1998) Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pathol*, 186: 90-98.
- Sugahara K, Rubin JS, Mason RJ, Aronsen EL & Shannon JM (1995) Keratinocyte growth factor increases mRNAs for SP-A and SP-B in adult rat alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol*, 269: L344-L350.
- Sweet SC (2006) Pediatric living donor lobar lung transplantation. *Pediatr Transplant*, 10: 861-868.
- Takeoka M, Ward WF, Pollack H, Kamp DW & Panos RJ (1997) KGF facilitates repair of radiation-induced DNA damage in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol*, 272: L1174-L1180.
- Tazelaar H & Starnes V (1994) Lung and heart-lung transplantation pathology. In: Kolbeck PC, Markin RS, McManus BM (eds.) Transplant pathology, *ASCP Chicago*.

- Thomson E (1930) Quantitative microscopic analysis. *J Geol*, 38: 193.
- Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM & Pierce GF (1994) Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest*, 93: 1298-1306.
- van den Berg TK, Döpp EA & Dijkstra CD (2001) Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. *Immunol Rev*, 184: 45-57.
- van Raemdonck D, Strüder M, Venuta F, Vlasselaers D, Wisser W & Erasmus ME (2004) Strategies in the prevention and the treatment of ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Eur Respir Mon*, 29: 66-88.
- van Scott MR, Hester S & Boucher RC (1987) Ion transport by rabbit nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5496-5500.
- Veldhuizen RA, Lee J, Sandler D, Hull W, Whitsett JA, Lewis J, Possmayer F & Novick RJ (1993) Alterations in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am Rev Respir Dis*, 148: 208-215.
- Viget NB, Guery BPH, Ader F, Nevieere R, Alfandari S, Creuzy C, Roussel-Delvallez M, Foucher C, Mason CM, Beaucaire G & Pittet JF (2000) Keratinocyte growth factor protects against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L1199-L1209.
- Voss K (2007) Integralgeometrie für Stereologie und Bildrekonstruktion. *Springer*.
- Ware LB & Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342: 1334-1349.
- Ware LB & Matthay MA (2002) Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282: L924-L940.
- Waters CM, Savla U & Panos RJ (1997) KGF prevents hydrogen peroxide-induced increases in airway epithelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 272: L681-L689.
- Weibel ER (1963) Morphometry of the human lung. *Springer*.
- Weibel ER (1990) Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Lenfant C & Gil J (ed.). Models of lung disease: microscopy and structural methods. *Marcel Dekker*, 199-252.
- Weibel ER (1981) Stereological methods in cell biology: where are we – where are we going? *J Histochem Cytochem*, 29: 1043-1052.
- Weibel ER (2000) Symmorphosis: on form and function in shaping life. *Harvard University Press*.
- Weibel ER (1984) The pathway for oxygen. *Harvard University Press*.
- Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D & Hechtman HB (1991) Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*, 78: 651-655.
- Welsh DA, Summer WR, Dobard EP, Neslon S & Mason CM (2000) Keratinocyte growth factor prevents ventilator-induced lung injury in an ex vivo rat model. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 1081-1086.
- Werner S (1998) Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9: 153-165.

Wilkes DS, Egan TM & Reynolds HY (2005) Lung transplantation: opportunities for research and clinical advancement. *Am J Respir Crit Care Med*, 172: 944-955.

Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S & Itoh N (1996) Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, 271: 15918-15921.

Yano T, Deterding RR, Simonet WS, Shannon JM & Mason RJ (1996) Keratinocyte growth factor reduces lung damage due to acid instillation in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15: 433-442.

Yano T, Mason RJ, Pan T, Deterding RR, Nielsen LD & Shannon JM (2000) KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L1146-L1158.

Yi ES, Williams ST, Lee H, Malcki DM, Chin EM, Yin S, Tarpley J & Ulich TR (1996) Keratinocyte growth factor ameliorates radiation and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol*, 149: 1963-1970.

Zhao G, Al Mehdi AB & Fisher AB (1997) Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol*, 273: L1112-L1117.

Zissel G, Ernst M, Rabe K, Papadopoulos T, Magnussen H, Schlaak M & Muller-Quernheim J (2000) Human alveolar epithelial cells type II are capable of regulating T-cell activity. *J Invest Med*, 48: 66-75.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doctormum, Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau für das Vertrauen in mich und die Überlassung des Themas dieser Dissertation bedanken. Ich danke ihr auch dafür, dass sie mir während der gesamten Arbeit immer unterstützend zur Seite stand. Die Zusammenarbeit mit ihr entfaltete in mir die Fähigkeit nicht nur in der Wissenschaft, sondern auch im klinischen Alltag analytisch denken und zugleich auf das Bauchgefühl hören zu können. Sie brachte mir bei im Leben immer die Zuversicht zu bewahren. Ich danke ihr für ihre wirklich sehr große Geduld und ihre Weisheit, für alles, was ich von ihr lernen durfte und für alles, was sie für mich im Laufe dieser Jahre getan hat. Ihre Unterstützung in einer damals sehr schwierigen Phase meines Lebens, die mit dem plötzlichen Verlust meines Vaters im April 2006 zu tun hatte, war unbezahlbar. Veronika gehört zu den Menschen, die in der Prägung meiner Persönlichkeit eine außerordentliche Rolle gespielt haben - ich bin sehr dankbar sie auf meinem Lebensweg getroffen zu haben.

Mein besonderer und ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heinz Fehrenbach (ehemals Klinische Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“, Philipps-Universität Marburg/heute Experimentelle Pneumologie, Forschungszentrum Borstel) für die Möglichkeit die Wissenschaft Stereologie aus erster Hand kennenzulernen und in seinem Labor damit arbeiten zu dürfen. Seine langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der Stereologie der Lunge sowie seine wertvollen Ideen, aufschlussreichen Anregungen und konstruktiven Ratschläge trugen wesentlich zum Erfolg der gesamten Arbeit bei.

Frau Dr. rer. nat. Antonia Fehrenbach (ehemals Klinische Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“, Philipps-Universität Marburg) möchte ich für die didaktisch sehr gute Betreuung in Fragen stereologisch-lichtmikroskopischer Analyse ganz herzlich danken.

Bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Sigrid Wilker, Frau Renate Plaß, Frau Gabriele Fuchs-Moll und Frau Petra Freitag sowie Frau Roswitha Naumann & Frau Tanja Rausch (beide ehemals Klinische Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“, Philipps-Universität Marburg) möchte ich mich ganz herzlich für die kompetente technische Unterstützung bedanken. Auch Frau Ulrike Berges und Herrn Khusin Kutlimuratov möchte ich für ihre freundliche Hilfe danken. Bei Frau Sandra Iffländer bedanke ich mich für die fürsorgliche Pflege der Tiere.

Herrn PD Dr. med. Markus Hirschburger gebührt der Dank für seine Hilfe bei den Lungentransplantationen.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Winfried Padberg bin ich für seine Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (FE 287/6-1).

Publikationen & Kongressbeiträge

Originalpublikation:

Sadovski J, Kuchenbuch T, Ruppert C, Fehrenbach A, Hirschburger M, Padberg W, Günther A, Hohlfeld JM, Fehrenbach H & Grau V (2008) Keratinocyte growth factor prevents intra-alveolar oedema in experimental lung isografts. *Eur Respir J*, 31: 21-28.

Kongressbeiträge:

Publizierte abstracts

Sadovski J, Fehrenbach A, Naumann R, Rausch T, Fehrenbach H, Padberg W & Grau V (2006) Keratinocyte growth factor prevents intraalveolar edema in rat lung isografts. *Eur Surg Res*, 38 (suppl. 1): 32.

Fehrenbach H, Sadovski J, Fehrenbach A, Dietzel E, Blöcher S, Naumann R, Rausch T, Padberg W & Grau V (2006) Keratinocyte growth factor (rHuKGF) increases surfactant protein A in rats and prevents alveolar oedema after orthotopic rat lung transplantation. *Eur Resp J*, 28 (suppl. 50): 779.

Nicht publizierte abstracts

Sadovski J, Fehrenbach A, Naumann R, Rausch T, Fehrenbach H, Padberg W & Grau V (2006) Keratinocyte growth factor prevents intraalveolar edema in rat lung isografts. *1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology*, 6.-9. September 2006, Paris.



Keratinocyte growth factor prevents intra-alveolar oedema in experimental lung isografts

J. Sadovsk^{*,§}, T. Kuchenbuch^{*,§}, C. Ruppert[#], A. Fehrenbach[†], M. Hirschburger^{*}, W. Padberg^{*}, A. Günther[#], J.M. Hohlfeld⁺, H. Fehrenbach[†] and V. Grau^{*}

ABSTRACT: Primary graft dysfunction, characterised by intra-alveolar oedema, is a major obstacle in pulmonary transplantation. The present study evaluates the potential of keratinocyte growth factor (palmiferin; Δ N23-KGF) for the prevention of oedema in lung transplants.

Intratracheal instillation of 5 mg·kg⁻¹ Δ N23-KGF was performed in Lewis rats on days 3 and 2 before explantation. Control animals obtained an equivalent volume of vehicle. Left lungs were isogeneically transplanted and the graft recipients were sacrificed 1 day later for stereological analysis of intra-alveolar oedema and bronchoalveolar lavage. The total protein and phospholipid content, as well as surfactant proteins, were measured. Surfactant activity was analysed with a pulsating bubble surfactometer.

In grafts from control treated donors, the fraction of intra-alveolar oedema amounted to 3.4 ± 1.1% of the total parenchymal volume. Treatment of donor lungs with Δ N23-KGF reduced oedema to a fraction of 1.6 ± 0.8%. In the lavage fluid of pulmonary grafts from Δ N23-KGF-treated donors, the total protein content was decreased compared with vehicle-treated lung transplants, whereas phospholipids did not differ. The protein fraction contained increased amounts of surfactant protein-C after Δ N23-KGF treatment and surfactant function was improved.

Treatment of donor lungs with palifermin protects against intra-alveolar oedema formation upon transplantation. This effect appears to be mediated by an improved surfactant homeostasis.

KEYWORDS: Keratinocyte growth factor, lung, oedema, primary graft dysfunction, transplantation

Transplantation is the only curative therapy for numerous patients suffering from end-stage lung diseases. During the first 3 months post-transplantation, ~13% of pulmonary allograft recipients die [1]. Primary lung graft dysfunction (PGD) and infections are the main reasons for this poor survival early after transplantation and both conditions frequently coexist [1, 2]. According to a recently proposed consensus definition, PGD is characterised by hypoxaemia and radiographic evidence of diffuse alveolar infiltrates [3]. Histopathological correlates of this syndrome are nonspecific alveolar damage and lung oedema [4].

Donor treatment with keratinocyte growth factor (KGF; fibroblast growth factor 7) might help to prevent PGD in pulmonary graft recipients, because KGF protects the lung in various models of acute lung injury, including hyperoxia, bleomycin, acid aspiration, mechanical injury, radiation, infections and even graft *versus* host disease [5]. Comparable to PGD, these models of lung

damage involve pulmonary oedema formation. Lung protection by KGF is mediated by several mechanisms: most importantly, KGF stimulates the proliferation of alveolar epithelial type II cells (AEIIs) and results in a pronounced AEII hyperplasia on days 2 and 3 after treatment [6, 7]. The barrier function of both the alveolar epithelium and the endothelium [8], as well as the capacity of fluid reabsorption from the alveolar space, is improved [9]. KGF increases surfactant protein and phospholipid levels *in vitro* and *in vivo* [10–12]. Donor treatment with exogenous surfactant has been shown to be effective in preventing PGD in experimental settings [13–15] as well as in a small clinical trial [16]. Stimulation of the endogenous surfactant system by the application of KGF appears to be an appealing approach for the prevention of lung transplantation-associated reperfusion injury.

The use of KGF or the more stable N-terminally truncated analogue Δ N23-KGF (palifermin) [17] in the context of transplantation of lungs from

AFFILIATIONS

*Laboratory of Experimental Surgery, Dept of General and Thoracic Surgery,

#Dept of Internal Medicine, University of Giessen Lung Center, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen,

†Clinical Research Group "Chronic Airway Diseases", Clinic of Internal Medicine (Respiratory Medicine), Philipps University of Marburg, Marburg, and

+Fraunhofer Institute of Toxicology and Experimental Medicine, Hannover, Germany.

§These authors contributed equally to the study.

CORRESPONDENCE

V. Grau, Laboratory of Experimental Surgery, Dept of General and Thoracic Surgery, University of Giessen Lung Center, Justus-Liebig-University Giessen, Rudolf-Buchheim-Str. 7, D-35385 Giessen, Germany.

Fax: 49 6419944709

E-mail: Veronika.Grau@chiru.med.uni-giessen.de

Received:

January 31 2007

Accepted after revision:

September 13 2007

SUPPORT STATEMENT

The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FE 287/6-1; Bonn, Germany).

STATEMENT OF INTEREST

Statements of interest for H. Fehrenbach and J.M. Hohlfeld can be found at www.erj.ersjournals.com/misc/statements.shtml

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

deceased donors is limited by the fact that the lungs are most effectively protected when treated with KGF 2–3 days before the injurious stimulus is applied. Lung protection by KGF might, however, be useful in living donor lobar lung transplantation that is performed in paediatric patients to mitigate the growing competition for deceased donor lungs [18]. As lung regeneration is also stimulated by KGF [19], both graft donor and recipient might profit from KGF application to donor lungs.

The aim of the present study was to evaluate the potential of donor lung treatment with Δ N23-KGF in order to prevent alveolar oedema formation after transplantation. The current authors used an experimental rat model of isogeneic orthotopic left lung transplantation involving short ischaemic times comparable to the situation in living donor lung transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Study design

Lung protection by KGF is only effective when the growth factor is applied 2–3 days before injury [5]. In contrast to living donor lungs, grafts from deceased donors can probably not be protected against PGD. Therefore, the current authors chose an experimental design resembling the living donor procedure, in which ischaemic times are kept as short as possible.

Inbred Lewis (LEW) donor rats were treated on days 1 and 2 with bioactive recombinant human Δ N23-KGF or vehicle *via* intratracheal instillation. On day 4, orthotopic left lung transplantation to isogeneic recipients was performed. Warm and cold ischaemic times were kept as short as possible. Oedema formation was evaluated by stereological methods, by protein and surfactant analysis in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid 24 h after transplantation. This point in time was chosen because in this experimental model, intra-alveolar oedema was obvious 1 day after transplantation and resolved on days 2 and 3 [20].

Animals

Male LEW (RT1^l) rats were raised under pathogen-free conditions according to Federation of European Laboratory Animal Science Associations standards and provided by Harlan Winkelmann (Borchen, Germany). Animal care and animal experiments were performed following the current version of the German Law on the Protection of Animals as well as the National Institutes of Health principles of laboratory animal care.

KGF-treatment and lung transplantation

Bioactive, purified, endotoxin-free Δ N23-KGF (palifermin) produced in *Escherichia coli* was provided by Amgen (Thousand Oaks, CA, USA). On day 1, animals weighing 200–270 g were anaesthetised by short time inhalation of isofluran (Forene; Abbot, Wiesbaden, Germany), intubated orally with a 16G intravascular catheter (Insyte; Becton Dickinson, Sandy, UT, USA), and instilled *via* the trachea with 5 mg Δ N23-KGF per kg body weight or an equivalent volume (200–270 μ L) of PBS. The treatment was repeated on day 2. On day 4, these rats served as donors for lung transplantation.

Orthotopic left lung transplantation was performed in the isogeneic LEW to LEW rat strain combination as described

[20]. In brief, a cuff technique was used for the vascular anastomoses and sutures with interrupted stitches for the bronchial anastomoses. Warm ischaemic times remained <20 min and cold ischaemic times <25 min. No immunosuppression was given.

Pulmonary grafts were harvested 24 h after transplantation for histology or BAL. Only grafts which were ventilated and supplied with blood were considered to be technically successful and included in the study.

Graft histology

The lungs were flushed *in situ* with 20 mL saline *via* the pulmonary artery and fixed by vascular perfusion with 1.5% glutaraldehyde, 1.5% paraformaldehyde dissolved in 0.15 M HEPES buffer, pH 7.4, at a hydrostatic pressure of 15 cmH₂O (1.5 kPa) for 20 min while the airway pressure was adjusted to 12 cmH₂O (1.2 kPa). Thereafter, the trachea was ligated and the heart-lung block was removed from the recipient rat. Fixation by perfusion was followed by 24 h immersion in the same fixative at 4°C.

After determination of the lung volume by fluid displacement, lungs were embedded into 2% aqueous agar-agar at 40°C, cooled to room temperature, stored at 8°C for 2–3 h, and then cut into 4-mm thick slices by means of a tissue slicer, with the first cut being at a random position within the first 4 mm. The slices were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer followed by overnight incubation in half-saturated aqueous uranyl acetate. Slices were dehydrated through a series of graded acetone, and embedded into glycol methacrylate (Technovit 7100; Kulzer, Wehrheim, Germany). After staining of semi-thin sections with methylene blue/Azur II, intra-alveolar oedema was determined by stereological analysis.

Stereological analysis

Intra-alveolar oedema was determined by point counting according to a two-level cascade sampling procedure [21] using a light microscope (Olympus BX51; Olympus, Copenhagen, Denmark) equipped with a computer-assisted stereology toolbox (CAST Grid; Visiopharm, Hersholm, Denmark). At level 1, the volume densities of nonparenchyma (airways, arteries, veins and pleura) and parenchyma (alveolar septa, airspace of alveoli and alveolar ducts) were estimated at a primary magnification of $4\times$. At level 2, the volume densities of alveolar and alveolar duct airspace (occupied by air or oedema fluid), alveolar septal tissue and capillary lumen were estimated at a primary magnification of $20\times$. At each level, a set of systematic uniform random sampled fields of view were collected for point counting. Volume densities, fractions of total lung volume, and absolute volumes of each compartment were calculated as described previously [22]. Absolute volumes of the transplants and the right native lungs were normalised to body weight of the donors and the recipient rats, respectively, and are given as mass-specific volumes.

BAL

Pulmonary graft recipients were anaesthetised and the trachea was cannulated. After sternotomy, the right main bronchi were clamped and the left transplanted lungs were each lavaged five times with 2 mL saline at 37°C. Thereafter, the right lungs were

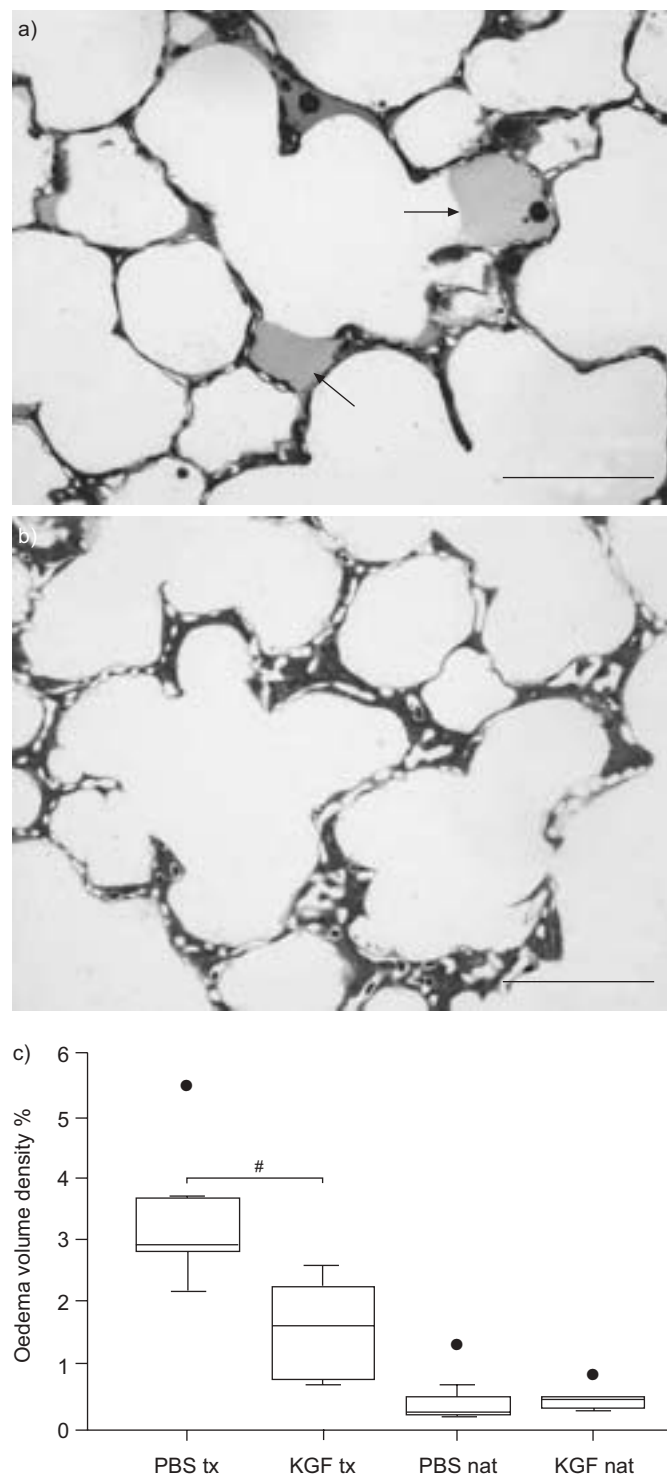


FIGURE 1. Histopathology of pulmonary isografts 1 day after transplantation. a) Semi-thin section of the lung parenchyma of a PBS-treated transplant stained with methylene blue/Azur II. The arrows indicate intra-alveolar oedema. b) Section of a pulmonary transplant which was pre-treated with keratinocyte growth factor (KGF; Δ N23-KGF). The alveolar walls are thickened due to alveolar epithelial type II cell hyperplasia. Intra-alveolar oedema is rare. c) Volume fraction (% total parenchyma) of the intra-alveolar oedema in lung transplants (tx) and right native lungs (nat) after PBS-treatment (n=6) or treatment with Δ N23-KGF (n=7). The box plots indicate median and percentiles 0, 25, 75 and 100. ●: data beyond $\pm 3 \times$ sd. #: $p \leq 0.01$. Scale bars = 100 μ m.

each lavaged five times with 3 mL saline. BAL fluid (BALF) was collected on ice, centrifuged for 15 min at $300 \times g$ and stored at -20°C until further analysis.

Analysis of BALF

Total proteins were quantified in BALF using a commercial assay kit (BCA; Pierce, Bonn, Germany). The content of the hydrophobic surfactant proteins (SP)-B and SP-C in the BALF was determined by ELISA as previously described [23, 24].

BALF was centrifuged at $48,000 \times g$ (1 h, 4°C) using a Beckmann L5-50 centrifuge (type 40 rotor; Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany) to isolate large surfactant aggregates (LA). The LA-containing pellets were resuspended in 0.9% NaCl and the relative LA content was assessed by relating the fraction of pelleted phospholipid to the total amount of phospholipid. Lipids were extracted from original BALF or the isolated LA fraction with chloroform/methanol according to the method of BLIGH and DYER [25], and organic phases were taken for quantification. Phospholipids were quantified by means of a colorimetric phosphorus assay as previously described [26].

Measurement of surfactant surface activity

Surface activity of surfactant material was measured with a pulsating bubble surfactometer [27]. Experiments were performed at hypophase concentrations of 1 mg phospholipids per mL. Briefly, 40 μL of the resuspended LA pellet were injected into the bubble chamber. Before starting bubble pulsation the material was allowed to stabilise for 5 min. Measurements were performed with a cycle speed of 20 cycles $\cdot \text{min}^{-1}$ for 5 min. Prior to bubble oscillation, phospholipid adsorption (γ_{ads}) was measured as the surface tension of the originated bubble after a time period of 10 s. Minimum surface tension at minimum radius of the bubble after 5 min of pulsation was defined as γ_{min} . Similarly, maximum surface tension at maximum radius was defined as γ_{max} . Data were digitalised and recorded by computer.

Statistical analysis

Data are given as mean \pm SD in the text, are presented in box plots in graphs, and were analysed with nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney rank sum test, with $p \leq 0.05$ set as the significance level.

RESULTS

Transplantation of Δ N23-KGF-treated lungs

LEW donor rats were treated on days 1 and 2 with Δ N23-KGF *via* intratracheal instillation, control donors obtained an equivalent volume of PBS. Lungs were transplanted on day 4 and harvested 24 h thereafter. The technical success rate was identical in both experimental groups: 86% for PBS-treated donors (n=28) and 85% for Δ N23-KGF-treated donors (n=40).

Graft histopathology

In transplants from PBS-treated donors, intra-alveolar oedema could be detected (fig. 1a). Alveoli containing protein-rich oedema fluid formed clusters surrounded by unimpaired lung parenchyma. Frequently, a quarter to a half of the alveolar area was filled with oedema, which lined the alveolar wall (fig. 1a). However, no severe damage of the lung parenchyma was seen. As described previously for lung isografts on day 1

TABLE 1 Results of stereological analysis of transplanted left lungs

Parameters	PBS treated	Δ N23-KGF treated
Subjects n	7	6
Body weight g	239.0 \pm 2.2	259.0 \pm 14.0 [#]
Mass-specific volumes mm³·g⁻¹ body weight		
Lung	11.1 \pm 3.0	12.7 \pm 1.1
Nonparenchyma	1.3 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5
Parenchyma	9.8 \pm 2.5	11.3 \pm 1.1
Air space	8.2 \pm 2.2	9.6 \pm 1.0
Alveolar oedema	0.32 \pm 0.11	0.18 \pm 0.10 [#]
Septal tissue	0.86 \pm 0.35	1.12 \pm 0.17
Capillary lumen	0.38 \pm 0.13	0.42 \pm 0.15

Data are presented as mean \pm SD, unless otherwise stated. Δ N23-KGF: N-terminally truncated keratinocyte growth factor analogue (palifermin). #: $p \leq 0.05$.

post-transplantation, the connective tissue surrounding blood vessels exhibited oedematous swelling and contained some mononuclear leukocytes [20].

Lung isografts originating from donors that were treated with Δ N23-KGF (palifermin) revealed pronounced hyperplasia of AEIIs (fig. 1b). This is a typical feature of rat lungs treated with KGF, indicating that the treatment was successful [5]. In comparison to control pulmonary transplants, the area of the intra-alveolar space filled with oedema was reduced (fig. 1b). The perivascular oedema and leukocytic infiltrate in KGF-treated pulmonary isografts did not differ from PBS-treated isografts.

Stereological analysis of intra-alveolar oedema

To quantify the intra-alveolar oedema in vehicle-treated and KGF-treated lungs, stereological analysis was performed (table 1; fig. 1c).

TABLE 2 Results of stereological analysis of native right recipient lungs

Parameters	Recipient of PBS-treated lung	Recipient of Δ N23-KGF-treated lung
Subjects n	7	6
Body weight g	241.1 \pm 1.4	258.3 \pm 5.5 [#]
Mass-specific volumes mm³·g⁻¹ body weight		
Lung	18.7 \pm 4.7	22.3 \pm 4.2
Nonparenchyma	2.3 \pm 0.4	2.3 \pm 0.6
Parenchyma	16.3 \pm 4.5	20.1 \pm 3.9
Air space	14.6 \pm 4.4	17.5 \pm 3.6
Alveolar oedema	0.06 \pm 0.06	0.08 \pm 0.05
Septal tissue	1.2 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4
Capillary lumen	0.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.4

Data are presented as mean \pm SD, unless otherwise stated. Δ N23-KGF: N-terminally truncated keratinocyte growth factor analogue (palifermin). #: $p \leq 0.05$.

In isografts originating from PBS-treated donors, the fraction of intra-alveolar oedema amounted to 3.4 \pm 1.1% of total parenchymal volume. Pre-treatment of donor lungs with Δ N23-KGF significantly ($p=0.005$) reduced the oedema to a fraction of 1.6 \pm 0.8% (fig. 1c). Relating intra-alveolar oedema volume to the alveolar air–blood barrier, oedema amounts to 41.1 \pm 17.8% of tissue volume in transplanted lungs of PBS-treated rats *versus* 16.6 \pm 9.8% after Δ N23-KGF-treatment ($p=0.005$). Mass-specific absolute oedema volume was also significantly reduced (table 1). The native right lung was included in the present analysis as an internal control (table 2). No differences were observed between the right native lungs from recipients of PBS-treated or Δ N23-KGF-treated left lungs.

Analysis of BALF

PBS-treated or Δ N23-KGF-treated grafts and the native right lung were lavaged separately. In addition, lungs from sex- and age-matched healthy LEW rats were included.

Transplantation of PBS-treated lungs resulted in a significant ($p \leq 0.01$) increase in the total protein content in the BALF from 2.9 \pm 0.2 mg per left lung in healthy controls to 12.9 \pm 4.2 mg per graft (fig. 2). Application of Δ N23-KGF before transplantation reduced the amount of protein to 6.4 \pm 1.4 mg per graft ($p \leq 0.01$). The protein content of the right native lungs of all experimental groups remained at about the same level.

SP-B and SP-C were measured in the BALF by ELISA. The total SP-B content in BALF from left control lungs, PBS-treated grafts and Δ N23-KGF-treated grafts was identical. The same was true for the right native lungs. Due to the increase in the total protein and phospholipid content upon lung transplantation, the SP-B/total protein ratio decreased, but no significant differences were obvious between PBS-treated and Δ N23-KGF-treated pulmonary isografts (fig. 2).

In contrast, the total SP-C content in BALF was higher in grafts compared with healthy control left lungs ($p \leq 0.05$). No significant difference was seen among PBS-treated and Δ N23-KGF-treated grafts, or among the right lungs from all experimental groups. As expected, the SP-C/total protein ratio was decreased ($p \leq 0.05$) in PBS-treated transplants. However, in BALF obtained from Δ N23-KGF-treated grafts the SP-C/total protein ratio did not differ from native control lungs, and was higher ($p \leq 0.01$) when compared with the ratios measured in PBS-treated grafts (fig. 2).

Transplantation increased the amount of phospholipids harvested from the left lung by BAL ($p \leq 0.01$). Among the right native lungs no changes were seen. Δ N23-KGF-treatment did not influence the phospholipid content in comparison to PBS-treated grafts. Consequently, the phospholipid/protein ratio decreased ($p \leq 0.01$) in PBS-treated pulmonary transplants, whereas in isografts from Δ N23-KGF-treated donors, this ratio did not differ from healthy control lungs (fig. 2). The difference between PBS-treated grafts and Δ N23-KGF-treated grafts was statistically significant ($p \leq 0.05$). LA content was slightly increased in Δ N23-KGF-treated lungs, but did not statistically differ from PBS-treated lungs (93.2 \pm 11.0 *versus* 82.2 \pm 15.6).

Surfactant activity

Surfactant activity was measured with a pulsating bubble surfactometer. The results are summarised in table 3. The

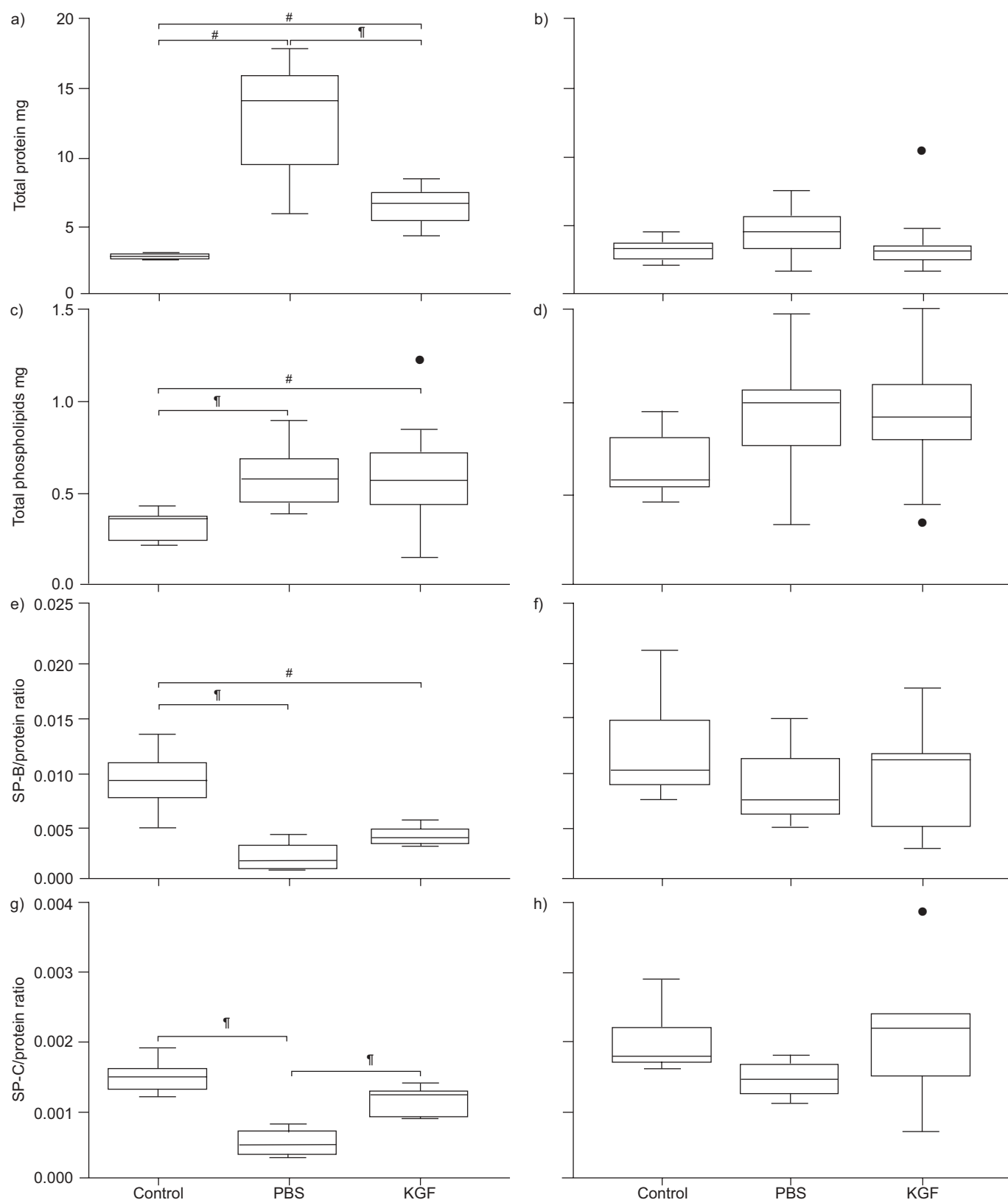


FIGURE 2. Analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of the left lungs (a, c, e, g) and the right lungs (b, d, f, h) of healthy controls and recipients of pulmonary isografts. Left lungs were transplanted and the right native lung of the recipients remained in the recipient. The total protein and phospholipid content in the BAL was determined, as well as the ratio of surfactant protein (SP)-B or SP-C to the total protein content. The box plots indicate median and percentiles 0, 25, 75 and 100. a–d) The numbers of observations were: control n=5; PBS n=9; and keratinocyte growth factor (KGF) n=10. e–h) The numbers of observations were: control n=5; PBS n=4; and KGF n=5. ●: data beyond $\pm 3 \times \text{SD}$. #: $p \leq 0.05$; ¶: $p \leq 0.01$.

surface tension (γ_{ads} , γ_{min} and γ_{max}) of the isolated surfactant tended to be reduced in Δ N23-KGF-treated transplants in comparison with PBS-treated grafts. This difference was statistically significant ($p \leq 0.05$) for γ_{max} . A similar effect was also seen for the right native lung of recipients of Δ N23-KGF-treated lungs in comparison to PBS-treated lungs.

DISCUSSION

The present study demonstrated that lungs from Δ N23-KGF-treated donor rats can be successfully transplanted. In addition, treatment of donor lungs with Δ N23-KGF protects against perioperative lung injury, which inevitably occurs during transplantation.

Impaired function of the air–blood barrier, resulting in the formation of intra-alveolar oedema is a hallmark of PGD [2]. Protection against PGD in lung grafts from Δ N23-KGF-treated donors compared with PBS-treated grafts was demonstrated in the present study by independent techniques. First, a stereological approach was chosen for quantification of lung oedema in lungs fixed by vascular perfusion, because this technique is more sensitive when compared with the analysis of the wet/dry weight ratio [22]. Sensitivity is important, because in the present experimental setting involving short ischaemic times the amount of intra-alveolar oedema is low. Furthermore, stereological data on lung oedema, but not wet/dry weight ratio data, have been shown to significantly correlate with lung function [22].

In a second approach, the current authors measured the protein content in the BALF. According to published data [13], BALF from PBS-treated lung transplants contained more protein compared with healthy control lungs. However, donor Δ N23-KGF-treatment resulted in a significantly decreased protein content in the BALF of lung transplants.

A direct functional analysis of the lung transplants was not performed because the volume density of the intra-alveolar oedema in PBS-treated grafts was too small to expect a severe impairment of blood oxygenation in comparison with Δ N23-KGF-treated lungs. A previous study investigating the effects of various preservation solutions on ischaemia/reperfusion

injury demonstrated that the oxygen tension measured during reperfusion was largely normal in rat lungs exhibiting a volume density of intra-alveolar oedema of up to 3%, but dropped sharply beyond 3% [22]. Although functional impairment cannot be inferred as being severe in PBS-treated grafts (3.4% oedema), it can clearly be expected to be worse than in KGF-treated grafts (1.6% oedema). However, such differences might be obscured by the minor functional impairments that were observed after KGF-treatment [28].

A large body of literature describes improved surfactant homeostasis after lung treatment with KGF and implicates that, at least in part, protective effects of KGF are mediated *via* surfactant [5, 29]. Surfactant function is impaired during the re-implantation response in rat lung transplants and instillation of surfactant improves early graft function [13]. Beneficial effects of exogenous surfactant application were additionally shown in mini-pigs [15], dogs [14] and in a small clinical study in human transplant patients [16]. Therefore, the current authors analysed the total phospholipid content of the BALF, as well as SP-B and SP-C, small hydrophobic proteins that are most important in terms of biophysical functions of surfactant [30].

In line with previous studies [13], the present results demonstrate that some characteristic parameters of pulmonary surfactant were changed upon lung transplantation in the experimental model: the total phospholipid content and the content of SP-C were increased in response to transplantation, whereas SP-B remained unchanged. However, the differences in the total amounts of these components were not significant between grafts from PBS- and Δ N23-KGF-treated donors, which may relate to the fact that the degree of injury was low in the experiments. The only parameter related to surfactant proteins which differed significantly was the SP-C/total protein ratio, which might be functionally relevant because SP-C increases the resistance of surfactant to inhibition by serum proteins or oedema fluid [30].

Surfactant from Δ N23-KGF-treated pulmonary grafts tended to be more active compared with PBS-treated grafts, with γ_{max} being significantly different. In contrast to the protein content of the BAL fluid, surfactant function was also reduced in the right native lungs of graft recipients, which might result from mechanical ventilation during surgery. In addition, the pulmonary graft appeared to contribute to the impairment of reduction function in the right native lung, since protection of the graft with Δ N23-KGF resulted in a better surfactant function in the native lung. This might be explained by a functional overload of the native lung in the presence of a damaged graft.

The time schedule to achieve effective lung protection by KGF-treatment has been carefully optimised previously by other authors [5]. Donor KGF-treatment 2–3 days before transplantation seems to be mandatory when aiming at a prevention of PGD. Therefore, KGF-treatment appears to be limited to living donor lobar lung transplantation. However, pulmonary allografts are additionally damaged by post-operative mechanical ventilation, infections and rejection. Further experimental studies will be needed to evaluate the protective role of KGF against these injuries. If so, recipients of lungs from deceased donors might also benefit from KGF application in the perioperative or post-operative phase.

TABLE 3 Surface activity of surfactant isolated from pulmonary transplants (tx) and native lungs (nat)			
	γ_{ads} mN·m ⁻¹	γ_{min} mN·m ⁻¹	γ_{max} mN·m ⁻¹
PBS tx	36.5±10.7	23.6±8.8	45.2±7.0
KGF tx	28.2±5.2	18.1±1.2	35.2±3.4 [#]
PBS nat	30.8±3.9	16.9±2.2	40.1±3.1
KGF nat	28.5±9.0	11.5±5.7	32.3±4.2 ^{#†}

Data are presented as mean±SD and n=4 for all observations. Graft donors were either vehicle-treated (PBS) or treated with N-terminally truncated keratinocyte growth factor analogue (KGF). γ_{ads} : phospholipid adsorption; γ_{min} : minimum surface tension at minimum radius of the bubble after 5 min of pulsation; γ_{max} : maximum surface tension at maximum radius. [#]: statistically significant difference between KGF-treated and PBS-treated lungs $p \leq 0.05$; [†]: statistically significant difference between the right native lungs of recipients of KGF-treated and PBS-treated lungs $p \leq 0.05$.

In conclusion, donor lung pre-treatment with palifermin reduced intra-alveolar oedema, the histopathological correlate of primary lung graft dysfunction, in the rat lung transplantation model. In living donor lung transplantation, palifermin treatment might be beneficial for donor and recipient, as keratinocyte growth factor has been evidenced to promote lung regeneration upon partial pneumonectomy [19]. The current authors suggest that donor lung treatment with palifermin might be a promising strategy for the prevention of early graft dysfunction in humans, particularly when living donor transplantations are performed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank S. Iffländer, who cared for the experimental animals and U. Berges (both Justus-Liebig-University, Giessen, Germany) for help with the illustrations. The authors are also grateful for the expert technical assistance of R. Plass, P. Freitag (both Justus-Liebig-University, Giessen, Germany), R. Naumann and T. Rausch (both Philipps-University, Marburg, Germany).

REFERENCES

- Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, *et al.* Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report – 2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 880–892.
- Wilkes DS, Egan TM, Reynolds HY. Lung transplantation: opportunities for research and clinical advancement. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 944–955.
- Christie JD, Van Raemdonck D, de Perrot M, *et al.* Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1451–1453.
- de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 490–511.
- Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L924–L940.
- Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, *et al.* Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes *in vivo*. *J Clin Invest* 1994; 93: 1298–1306.
- Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, *et al.* Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells *in vivo* is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J* 1999; 14: 534–544.
- Barazzone C, Donati YR, Rochat AF, *et al.* Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice. *Am J Pathol* 1999; 154: 1479–1487.
- Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, Nelson S. Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 55: 1777–1784.
- Sugahara K, Rubin JS, Mason RJ, Aronsen EL, Shannon JM. Keratinocyte growth factor increases mRNAs for SP-A and SP-B in adult rat alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol* 1995; 269: L344–L350.
- Morikawa O, Walker TA, Nielsen LD, Pan T, Cook JL, Mason RJ. Effect of adenovector-mediated gene transfer of keratinocyte growth factor on the proliferation of alveolar type II cells *in vitro* and *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 626–635.
- Yano T, Mason RJ, Pan T, Deterding RR, Nielsen LD, Shannon JM. KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1146–L1158.
- Erasmus ME, Petersen AH, Hofstede G, Haagsman HP, Bambang Oetomo S, Prop J. Surfactant treatment before reperfusion improves the immediate function of lung transplants in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 665–670.
- Günther A, Balser M, Schmidt R, *et al.* Surfactant abnormalities after single lung transplantation in dogs: impact of bronchoscopic surfactant administration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 344–354.
- Hohlfeld JM, Struber M, Ahlf K, *et al.* Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischaemia-reperfusion injury in minipigs. *Eur Respir J* 1999; 13: 1037–1043.
- Strüber M, Hirt SW, Cremer J, Harringer W, Haverich A. Surfactant replacement in reperfusion injury after clinical lung transplantation. *Intensive Care Med* 1999; 25: 862–864.
- Hsu E, Osslund T, Nybo R, *et al.* Enhanced stability of recombinant keratinocyte growth factor by mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 2006; 19: 147–153.
- Sweet SC. Pediatric living donor lobar lung transplantation. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 861–868.
- Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, Tribble CG, Laubach VE. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation* 2002; 106: I120–I124.
- Schmidt A, Sucke J, Fuchs-Moll G, *et al.* Macrophages in experimental lung isografts and allografts: infiltration and proliferation *in situ*. *J Leukocyte Biol* 2007; 81: 186–194.
- Ochs M. A brief update on lung stereology. *J Microsc* 2006; 222: 188–200.
- Fehrenbach A, Fehrenbach H, Wittwer T, Ochs M, Wahlers T, Richter J. Evaluation of pulmonary edema: stereological *versus* gravimetric analysis. *Eur Surg Res* 2001; 33: 270–278.
- Kraemer HJ, Schmidt R, Guenther A, Becker G, Suzuki Y, Seeger W. ELISA technique for quantification of surfactant protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1540–1544.
- Schmidt R, Steinhilber W, Ruppert C, *et al.* An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP)-C in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 65: 470–474.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911–917.
- Rouser GS, Fleischer S, Yamamoto A. Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970; 5: 494–496.

- 27** Enhorning G. Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 1977; 43: 198–203.
- 28** Hohlfeld JM, Hoymann HG, Tschernig T, Fehrenbach A, Krug N, Fehrenbach H. Keratinocyte growth factor transiently alters pulmonary function in rats. *J Appl Physiol* 2004; 96: 704–710.
- 29** Fehrenbach A, Bube C, Hohlfeld JM, *et al.* Surfactant homeostasis is maintained *in vivo* during keratinocyte growth factor-induced rat lung type II cell hyperplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1264–1270.
- 30** Griesse M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999; 13: 1455–1476.